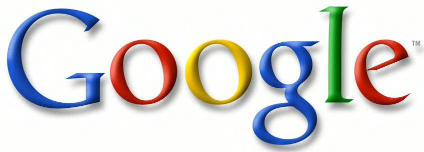


# MEDDELELSER

FRA

# CARLSBERG LABORATORIET.

UDGIVNE

VED

LABORATORIETS BESTYRELSE.

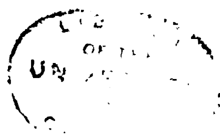
---

TREDIE BIND.

---

FØRSTE HEFTE.

---



KJØBENHAVN.

I KOMMISSION HOS H. HAGERUP.

THIELES BOGTRYKKERI.

1891.



Pris: 4 Kr.

## Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet

udgaae i tvangfrie Hefter. Naar der er udkommet saa mange Hefter, at deraf passende kan dannes et Bind, vil der blive leveret særskilt Titelblad og Indholdsliste med Angivelse af den Aarrække, som Bindet omfatter.

---

## Compte-rendu des travaux du laboratoire de Carlsberg.

Paraît par livraisons à des époques indéterminées. A mesure qu'il en paraîtra un nombre suffisant pour faire un volume, les abonnés recevront un titre imprimé en même temps qu'une table des matières, avec l'indication de la période qu'embrasse le volume.

---

# MEDDELELSER

FRA

# CARLSBERG LABORATORIET.

UDGIVNE

VED

LABORATORIETS BESTYRELSE.

III. BIND.

MED TRÆSNIT I TEXTEN.

1891—1894.




AVEC UN RÉSUMÉ EN FRANÇAIS.

KJØBENHAVN.

I KOMMISSION HOS H. HAGERUP.

THIELES BOGTRYKKERI.

1894.

# Indhold af III. Bind.

## Første Hefte, 1891.



## Andet Hefte, 1892.

## Tredie Hefte, 1894.

# Om Rendyrkningsmethoderne og særlig om Kochs Pladekultur og dens Fejlgrændse.

Af

Just Chr. Holm.

---

## I. Hovedpunkterne i Rendyrkningsmethodernes Udvikling.

Spørgsmaalet om Fremstilling af Renkulturer er langtfra noget nyt; det Princip, som ligger til Grund derfor, og som ogsaa til alle Tider har været anerkjendt, er dette, at benytte det enkelte Individ som Udgangspunkt for Undersøgelsen. At man ad den Vej vil faa en Renkultur, følger af sig selv. Formaalet med Renkulturerne er imidlertid et dobbelt, idet disse dels kunne anvendes i udviklingshistoriske og morfologiske Øjemed, dels benyttes til fysiologiske Forsøg, derfor ere ogsaa de Fordringer, som stilles, naar Talen er om Experimenter i en af disse to Retninger, forskjellige, idet man i sidstnævnte Øjemed kræver en Massekultur, noget som man netop søger at undgaa, naar Talen er om at erholde udviklingshistoriske og morfologiske Oplysninger.

Inden jeg begynder paa at omtale Rendyrkningsspørgsmaalet nærmere og i korte Træk at følge dets historiske Udvikling, vil jeg blot bemærke, at de tidligere Fremstillinger heraf skyldes Kemikere og Medicinere; idet jeg har studeret Spørgsmaalet som Botaniker, har jeg kunnet fremdrage et og andet, som tidligere ikke er blevet paaagtet.

Begyndelsen paa denne Bane blev først gjort i udviklingshistorisk-morfologisk Retning, det vil derfor være naturligst først at omtale de herhen hørende Forfattere.

Kützing omtaler (Grundzüge der philosophischen Botanik, I Bd. 1851. P. 233), at han for at iagttage Gjærcellen under dens Udvikling har anvendt den Methode, som Mitscherlich angiver

i sin Lehrbuch der Chemie I. P. 371[1]). Kützing siger herom følgende: »Man fordeler noget frisk Overgjær i Ølurt og fortynder en Draabe heraf med Ølurt saa længe, indtil man i en Draabe af denne Vædske kun observerer en eller to Gjærceller. En saadan Draabe anbringer man paa et Objektglas og lægger et Dækglas derpaa, dette tilkittes med en tyk Kopallak. Man anbringer nu Mikroskopet med Præparatet om muligt i et Værelse, hvis Temperatur er mellem 18 og 20°. Den første Celle maa man nøjagtig indstille i Mikrometerkorset, for at man ikke skal tage fejl af denne og de senere udviklede«. En lignende Meddelelse om Mitscherlichs Forsøg med udførlig Beskrivelse af, hvorledes denne iagttog, hvad der gik for sig under Væxten af den enkelte Gjærcelle og dennes Formering under Mikroskopet, findes ogsaa hos Franz Schulze (Lehrbuch der Chemie für Landwirthe. II Bd. II Abtheil. Leipzig 1860 P. 120), uden at denne Forfatter dog angiver, hvor denne Meddelelse findes hos Mitscherlich. Vi finde altsaa allerede hos Mitscherlich ikke alene Principet, Udgangspunktet fra een Celle, tydeligt udtalt, men der er her tillige anvist en Methode til den udviklingshistoriske Undersøgelse og, morfologisk set, egentlig givet alt, hvad vi vide den Dag idag om Knopskydningen.

Den enkelte Spores Spiring hos forskjellige Svampe og de derpaa følgende første Udviklingsstadier iagttoges allerede af Ehrenberg (Epistola de Mycetogenesi, Nov. act. Acad. nat. cur. 1821) og senere navnlig af Tulasne (Selecta fungorum carpologia. Paris 1861) og De Bary (Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten. Leipzig 1866). Den sidstnævnte Forsker foretog Rendyrkningsforsøg af Mucorineerne (A. de Bary und M. Woronin: Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Pilze, II Reihe, Frankfurt 1866), idet han gik ud fra eet Sporangium. Forsaavidt den Vegetation, der anvendtes, virkelig havde udviklet sig i et kimfrit Rum, vil en Renkultur paa den Maade ogsaa i de allerfleste Tilfælde kunne erholdes. Pasteur har senere (1872 og 1873) i sine fysiologiske Experimenter med Mucor racemosus og Mucor Mucedo (Études sur la bière, 1876, P. 127 og 138) anvendt samme Fremgangsmaade. Fuldstændig Sikkerhed for en absolut Renkultur kunde denne Fremgangsmaade imidlertid ikke give, da der paa et saadant Sporangium kan sidde fremmede Svampesporer og Bakterier, som altsaa kunne føres med ind i Forsøget.

---

[1]) I ovennævnte Værk: E. Mitscherlich, Lehrbuch der Chemie I Bd. P. 371 findes der imidlertid hverken i 1ste Udgave (Berlin 1831) eller i 2den do. (1834) noget herom.

Et Skridt videre gik **Brefeld**, idet han ikke blot iagttog den enkelte Spores Spiring, men tillige ved direkte mikroskopisk Undersøgelse forfulgte dens hele Udvikling indtil det Moment, hvor den af Sporen fremkomne Plante atter selv havde dannet Sporer. Om sin Fremgangsmaade meddeler han følgende (Methoden zur Untersuchung der Pilze; Landwirthschaftliche Jahrbücher, Jahrg. IV, 1875, P. 160—61): Man tager af vedkommende Svamp en Frugtbærer med Sporer eller et lille Parti Sporer ved Hjælp af en fin Naalespids og fordeler det i en Draabe udkogt Vand i et Urglas, dernæst sættes der saa meget Vand til, at der i en lille Draabe, udtaget med en fin Naal, kun findes en eller to Sporer; en saadan Draabe anbringes paa et Objektglas. Heldigst er det at trække Draaben ud i Længden og da fjærne andre muligt tilstedeværende Sporer paa en nær ved Hjælp af Filtrerpapir. Ere vedkommende Svampesporer meget smaa, maa man først lade dem spire i en Næringsvædske i et tildækket Urglas, under hvilken Proces de svulme stærkt, og saa paa ovenanførte Maade udsaa disse, som nu ere betydelig større end de oprindelige Sporer. (En Angivelse af denne Fremgangsmaade findes tillige i denne Forfatters Botanische Untersuchungen über Schimmelpilze, II Heft, 1874, P. 76 Anm.). Disse her beskrevne Kulturer kaldes Objektglaskulturer. **Brefeld** sætter nu Næringsvædske til; denne maa imidlertid ikke fordampe, og Invasion af fremmede Sporer maa forhindres. I alle de Tilfælde, hvor man kan nøjes med at foretage kortvarige Undersøgelser med cá 1 Times Mellemrum, er det tilstrækkeligt at mærke sig Sporens Plads og efter hurtig Iagttagelse paa Mikroskopbordet atter at anbringe Objektglaskulturen under fugtig Klokke. Skal Sporen og den deraf udviklede Svamp derimod undersøges i længere Tid, saa sætter **Brefeld** Gelatine til Næringsvædsken, for at den ikke skal fordampe, og over Præparatet anbringer han en lille Skjærm af Papir, som befæstes paa Mikroskopets Tubus for saa vidt muligt at holde fremmede Kim ude. Af oven anførte fremgaar, at Undersøgelsen ikke foregaar hele Tiden paa Mikroskopbordet, men **Brefeld** foretager af og til en Kontrol, for at han af de forskjellige Iagttagelser kan sikre sig den fuldstændige Udviklingscyklus. En uafbrudt Iagttagelse er, naar Talen er om større Svampe, ikke engang mulig, dels paa Grund af den Størrelse, Forsøgsobjektet efterhaanden antager, dels ogsaa fordi Udviklingen kræver, at der jævnlig sættes Næring til. **Brefeld** anvender ogsaa i flere Tilfælde fugtige Kamre, men erklærer, at Kamre med hængende Draabe ikke egne sig til disse Undersøgelser. Derimod anbefaler han de v. **Recklinghausenske** og navnlig til visse

Undersøgelser en Modifikation heraf. Det fremgaar tydeligt af Brefelds Meddelelser om disse sidste, som han f. Ex. anvendte ved sine Undersøgelser over Bacillus subtilis, at han har arbejdet med et større Antal Kim i hvert Kammer. En Beskrivelse saavel af disse Kamre som iøvrigt ogsaa af hans hele Fremgangsmaade findes i Botanische Untersuchungen über Schimmelpilze, IV Heft, 1881, Afsnittet Culturmethoden zur Untersuchung der Pilze.

At der, saaledes som Brefelds Forsøg ere indrettede, ikke altid, navnlig for Objektglaskulturernes Vedkommende, opereres med absolute Renkulturer, er givet; det er imidlertid efter Opgavens Natur heller ikke nødvendigt, kun maa en Infektion udefra ikke hæmme Væxten af den Organisme, hvis Udvikling man vil studere. Pointen i Brefelds Methode er den direkte mikroskopiske Iagttagelse af alle Udviklings-Stadierne, ikke blot Sporens Spiring og de derpaa følgende første Udviklingstrin, og, forsaavidt dette overholdes, kan naturligvis ingen Fejltagelse finde Sted, selv om en fremmed Organisme muligvis begynder sin Væxt ved Siden af den, man studerer. Det er altsaa ikke alene ikke nødvendigt, naar Talen er om udviklingshistoriske Undersøgelser med Individet som Udgangspunkt, at arbejde med een Celle i det fugtige Kammer eller under Mikroskopet — hvilket ogsaa fremhæves af Brefeld i hans sidstnævnte Afhandling fra 1881 P. 18 — man ønsker tvertimod flere, helst saa mange som muligt, for at kunne faa saa mange Iagttagelser som muligt ud af sit Forsøg; ja man kan kort sagt godt arbejde uden Renkultur. Hvad der her er det væsentlige, belyses paa en træffende Maade i de mønsterværdige Undersøgelser, som L. Klein i den nyeste Tid har anstillet med Bakterier og Bakteriesporer (Botanische Bakterienstudien I. Centralblatt f. Bakteriologie und Parasitenkunde, Bd. VI, 1889, P. 386). »De Synspunkter«, siger han, »som ledede mig ved de her meddelte Undersøgelser, vare morfologisk-udviklingshistoriske, mig interesserede hos de to første Baciller kun Maaden, hvorpaa Sporens Spiring og Sporedannelsen gik for sig og forøvrigt Individets Udviklingshistorie, derfor var det ogsaa muligt at arbejde med den ubevægelige B. sessilis uden Renkultur«.

Heri ligger den væsentlige Differens mellem denne Slags Undersøgelser og dem, som der kræves, naar man ønsker at fremstille Massekulturer til fysiologiske Experimenter. Her er den direkte Kontrol paa Mikroskopbordet umulig, andre Forhold gjøre sig her gjældende, og derfor er Methoden ogsaa anderledes, om den end i Principet bør være den samme. De foran beskrevne Methoder ere derfor ogsaa under disse Omstændigheder ubrugelige. Til saadanne

Forsøg have nogle Forskere anvendt Vædsker, andre derimod fast Næringssubstrat.

Vædsker anvendes dels ved den fysiologiske Rendyrknings-Methode (Pasteur og flere af hans Samtidige), dels ved den saakaldte Sprednings- eller Fortyndings-Methode (Lister, Hansen).

Blandt de Forfattere, som have behandlet Sagen fra den fysiologiske Side, skulle vi dvæle ved Pasteur. Den berømte Forsker udtaler sig om Renkultur-Spørgsmaalet i sine Études sur la bière (1876), Kap. V, P. 224—227. Det, Pasteur og de Forskere, som anvende den fysiologiske Methode til Fremstilling af Renkulturer, lægge til Grund for denne, er de forskjellige Mikroorganismers forskjellige fysiologiske Egenskaber og da navnlig den Omstændighed, at disse i forskjellige Næringsvædsker kunne vise en større eller ringere Formeringsevne og, hvis Næringsvædsken er ugunstig, en større eller mindre Modstandskraft, saa at nogle kunne bevare deres Liv længere end andre. Det er altsaa en Konkurrence mellem Arterne, som anstilles, hvor den stærkere, ɔ: den mest formeringsdygtige, efterhaanden vil faa Overvægten, men den Mulighed vil jo altid være tilstede, at den eller de svagere Arter ved denne Behandling kun blive hæmmede i deres Udvikling men ikke dræbte, og at de altsaa ved given Lejlighed igjen ville kunne faa Overmagten, naar Vilkaarene stille sig ugunstigt for den begunstigede Art, lige saa vel som det Tilfælde ogsaa kunde tænkes, at to eller flere Arter, som bleve udsatte for denne Behandling, vare lige modstandsdygtige overfor denne. Det beror altsaa paa et rent Tilfælde, hvorvidt man ved en saadan Methode faar en Renkultur eller ikke. I Aaret 1883 gav Hansen (Undersøgelser over Alkoholgjærsvampenes Fysiologi og Morfologi; Medd. fra Carlsb. Laborat. II Bd. 2det Hefte, P. 46—47) en kort Fremstilling af Pasteurs Methoder og deres Rækkeevne, og i Tidsskriftets nærværende Hefte findes af samme Forfatter en udførligere Fremstilling deraf, ledsaget af Experimenter, ved hvis Udførelse jeg har assisteret.

Vi skulle nu i Korthed, efter at have omtalt den fysiologiske Methode, beskrive Fortyndingsmethoden og nævne de vigtigste af de Forskere, som have benyttet den. Den blev først bragt i Anvendelse af Lister, som benyttede den til dermed at fremstille en Renkultur af en Mælkesyrebakterie. Han beskriver nærmere sin Fremgangsmaade i to forskjellige Afhandlinger (On the nature of fermentation; Quaterly Journal of microscopical science, 1878, Bd. 18, P. 190, og On the lactic fermentation and its bearing on pathology;

Transactions of the Pathological Society of London, 1878, Bd. 29, P. 445) væsentlig paa samme Maade. »Det faldt mig ind« — siger han i den førstnævnte Afhandling — »at dersom man kunde beregne med en vis Grad af Nøjagtighed det Antal Bakterier, der findes i en bestemt Mængde sur Mælk, og man da fortyndede denne Mælk med en i Forhold dertil svarende Mængde kogt Vand, saa vilde man kunne faa den fortyndede Mælk behandlet saaledes, at enhver Draabe deraf, med hvilken vi vilde inficere kogt Mælk, maatte komme til at indeholde i Gjennemsnit een Bakterie«. Han beskriver dernæst meget udførligt, hvorledes han bestemmer det Antal Bakterier, der findes i den sure Mælk. Ved Hjælp af en dertil indrettet Sprøjte afsætter han en meget ringe Vædskedel (f. Ex. $^1/_{50}$ af en Draabe) paa et Objektglas og dækker denne med et Dækglas, hvis Størrelse i Forhold til Synsfeltet i Mikroskopet han kjender. Draaben er netop saa stor, at den akkurat dækkes af Dækglasset. Ved nu at tælle Bakterierne i forskjellige Synsfelter og deraf beregne Gjennemsnitstallet for et Felt og ved at udregne, hvormange Synsfelter der findes paa Dækglasset, beregner han, hvormange Bakterier der findes i den hele lille Vædskedel ($^1/_{50}$ Draabe), og herefter beregner han atter, hvormeget sterilt Vand han maa sætte til for at faa kun een Bakterie i Gjennemsnit i hver lille Vædskedel. Han siger dernæst: »Jeg fandt da, at jeg til en Prøve af Vædsken maatte sætte ikke mindre end en Million Dele kogt Vand for at sikre mig, at der var mindre end een Bakterie i Gjennemsnit i hver Draabe. Jeg inficerede da 5 Glas, som indeholdt kogt Mælk, kun i et af disse løb Mælken sammen, og kun dette indeholdt Bact. lactis, de andre vare endnu efter 14 Dage uforandrede og indeholdt ikke Bakterier«.

Den samme Fremgangsmaade anvendtes senere af Nägeli og Fitz.

Selv om Fortyndingen er saa stærk, at der kun i et ringe Antal af de inficerede Kolber finder Udvikling Sted, medens Resten vedbliver at være sterile, er dette dog ingenlunde et Bevis for, at de inficerede Kolber indeholde Renkulturer, dette har blandt andet ogsaa de Vandanalyser, som jeg i de sidste Aar har foretaget i et temmelig betydeligt Antal, oftere vist.

Idet Spredningen kombineres med en Tælning bliver denne Methode, saafremt Beregningen er rigtig, vel paalideligere, men en nøjagtig Talangivelse af Individer i et bestemt Rumfang af Blandingen kan, naar Talen er om Bakterier, ikke finde Sted paa denne Maade, og en jævn Fordeling af Cellerne er meget vanskelig, for ikke at sige umulig, hvad mine Vandanalyser ogsaa have vist.

Men selv om man virkelig overvinder disse Vanskeligheder, trænger et nyt Spørgsmaal sig frem: Hvorpaa kan man kjende, at dette virkelig er naaet? Hvorledes er man i Stand til at adskille de Kolber, som kun ere inficerede med een Celle, fra dem, som trods Beregningen ere blevne inficerede med flere?

Dette Spørgsmaal blev, som vi nu skulle se, først løst af E. Chr. Hansen. Herved blev Fortyndingsmethoden først en exakt Methode. Den første Meddelelse om sin Methode gav Hansen i Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet I Bd. 4de Hefte, 1881, P. 407 og en udførligere Beskrivelse i samme Tidsskrifts II Bd. 2det Hefte, 1883, i Afhandlingen: »Om Ascosporedannelsen hos Slægten Saccharomyces« under Afsnittet »Methoder«, P. 51 o. f. Hansens Fortyndingsmethode har følgende to vigtige og nye Momenter, nemlig dels et Middel til en nøjagtig Tælning og dels et Kjendetegn, ved hvilket man kan afgjøre, om Kolben efter Infektionen har modtaget een eller flere Celler. Tælningen udføres ved Hjælp af et paa Midten kvadreret Dækglas, paa hvilket en Draabe af den fortyndede og omrystede Vædske anbringes. Draaben maa være saa lille, at den ikke paa noget Sted kommer udenfor det store Kvadrats Grændser; dette er yderligere inddelt i smaa Kvadrater, og en nøjagtig Tælning af alle Cellerne kan her finde Sted. Ved Hjælp af dette kvadrerede Dækglas er det ogsaa muligt direkte at udsaa een Celle; man maa da anvende en saa stærk Fortynding, at der kun findes een Celle i Draaben og derpaa anbringe hele Dækglasset i en Kolbe med Næringsvædske. Kjendetegnet paa, hvorvidt en Kolbe efter Infektionen har modtaget en eller flere Celler, er Antallet af Gjærpletter, som danne sig paa Siderne og Bunden af de inficerede og derefter stærkt rystede Kolber. Kun de Kolber, som vise een Gjærplet, give Sikkerhed for at indeholde en Renkultur stammende fra een Celle. Ved disse nye Momenter kommer Sikkerheden først frem.

Ved Hjælp af denne Methode fremstillede Hansen alle sine Renkulturer af de sex Saccharomycesarter, som han beskrev i 1882—83, og sine Rendyrkninger i det store til Bryggeriet Gamle Carlsberg.

Hansens Fortyndingsmethode kan imidlertid kun anvendes, naar der arbejdes med Celler, hvis Vægtfylde er saa stor, at de bundfældes. Den er derfor kun bleven benyttet til Renkulturer af Gjærceller; paa Bakteriologiens Omraade fik den ikke nogen Anvendelse, selv Zoogloea-Masser kunne ikke kontrolleres i Vædsker paa den Maade. Betingelsen er, at vedkommende Celler maa knytte sig fast til Glassets Væg, ellers er ingen sikker Observation mulig.

Fortyndingsmethoderne ved Hjælp af Vædsker anvendes nu kun sjælden, efterat de bekvemmere og billigere Gelatinemethoder ere komne i Brug.

Til Fremstilling af Massekulturer blev, som allerede tidligere omtalt, foruden Vædsker ogsaa anvendt fast Næringssubstrat. Det var Schroeter, som ved sine Undersøgelser over Pigmentbakterierne (Ueber einige durch Bakterien gebildete Pigmente; Beiträge zur Biologie der Pflanzen, I Bd., 2det Hefte, 1872, P. 109) blandt andet anvendte Kartoffelskiver som Næringsbund for disse. Han havde lagt Mærke til, at der paa Kartoffelskiver, som i nogen Tid havde været udsatte for Luften, udviklede sig Pletter eller Draaber af forskjelligt Udseende (forskjellige i Farve og Form); hver af disse Pletter bestod som oftest af een bestemt Art af Mikroorganismer, som altsaa en Tidlang kunde udvikle sig her uafhængige af hverandre. Paa denne Maade blev han Grundlæggeren af Rendyrkningsmethoden paa fast Næringsbund.

Robert Koch var den, som egentlig uddannede denne Methode videre. Han giver Oplysning herom i sin Afhandling: »Zur Untersuchung von pathogenen Organismen« (Mittheil. aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte I Bd. Berlin, 1881, P. 1). Som noget for sin Methode ejendommeligt fremhæver Koch, at Substratet, foruden at det er fast, har den heldige Egenskab tillige at være i temmelig Grad gjennemsigtigt, og at det endvidere er muligt at variere den i Gelatinen indblandede Næring, eftersom det gjøres nødvendigt for de paa den dyrkede forskjellige Mikroorganismer.

Kochs første Fremgangsmaade (1881) bestod i ved Indpodningsstriber i Gelatine at fordele Kimene i denne; ved Hjælp af en steril Platintraad, som var dyppet i Infektionsvædsken, ridsedes i den stivnede Gelatine Striber ved Siden af hverandre, naturligvis uden paany at dyppe Naalen i Vædsken, saaledes at de sidste Indpodninger kun kom til at indeholde faa Kim, og de deraf udviklede Kolonier optraadte isolerede. At denne Methode imidlertid er alt andet end fin, vil man let kunne indse; mange af de isolerede Kolonier bestaa i Virkeligheden ikke udelukkende af een Art, men af flere. Ved fra en saadan Koloni atter at foretage ny Udsæd med Podestriber og navnlig ved at gjentage dette Experiment nogle Gange, bliver Sandsynligheden for en Renkultur ganske vist større og større, men naar denne opnaas, derom ved man aldeles intet. Efter denne Fremgangsmaade blev der arbejdet i Kochs Laboratorium indtil ind i Aaret 1883.

For at forstaa, hvorledes Koch kunde lade sig nøje med en saa ufuldkommen Fremgangsmaade, maa man erindre hans da-

værende Standpunkt til Speciesspørgsmaalet for Bakteriernes Vedkommende, og at han i den Retning endog gik videre end Cohn, idet han nemlig gik ud fra, at Arterne frembøde konstante Differenser i Formen, og at man ved Hjælp af Mikroskopet derved kunde skjelne imellem dem. Den rige Pleomorfisme, der i Virkeligheden findes, erkjendte han dengang slet ikke.

Denne Methode erstattede Koch imidlertid senere med en anden, den saakaldte Pladekulturmethode, som ifølge Hueppe første Gang blev demonstreret ved en hygieinisk Udstilling og i et Foredrag af Koch paa det 11te tyske Lægemøde i Berlin 1883. Den gaar ud paa at fordele Kimene ved Rystning i en flydende Næringsgelatine; naar Gelatinen stivner, ville Kimene ligge fast og kunne udvikle sig uafhængigt af hverandre til selvstændige Kolonier. Disses Renhed bestemmes efter Koch tildels efter deres Udseende, Farve, Form, Bakteriernes Peptoniseringsevne osv. Hvad Fordelingen af Kimene angaar, da er det i Virkeligheden det samme Princip, han anvender, som i de ældre Fortyndingsmethoder med Vædsker; her mangler imidlertid ogsaa det sikre Udgangspunkt, hvilket dog for mange Bakteriers Vedkommende næppe er muligt at sikre sig. Koch og hans Skole have lige saa lidt som Pasteur holdt fast ved Principet: den enkelte Celle. Der er her ligesom i Listers Methode Sandsynlighed for en Renkultur tilstede, men Visheden mangler. Den faas først, naar man fra Begyndelsen af efter Fordelingen af Cellerne i Gelatinen observerer den enkelte Kim og dens Udvikling, indtil den har dannet en makroskopisk kjendelig Koloni.

Det er dette, som E. Chr. Hansen har gjort for Gjærcellernes Vedkommende (Meddel. fra Carlsb. Laborat. II Bd. 2det Hefte, 1883, P. 61 og samme Tidsskrifts II Bd. 4de Hefte, 1886, P. 155—165), idet han efter Fordeling af Cellerne i Næringsgelatinen anbringer en Del af denne i et fugtigt Kammer, i hvilket han kan observere de enkelte Celler, markere deres Plads og følge deres Udvikling under Mikroskopet, saaledes at han garanterer sig den Vegetationsplet, som han senere benytter til Fremstilling af en Massekultur. Lige overfor Bakterier er denne strænge Fremgangsmaade kun undtagelsesvis bleven anvendt, og for mange Formers Vedkommende synes det ogsaa for Øjeblikket at være umuligt. I alle disse Tilfælde vedbliver Kochs Pladekultur at være den bedste Fremgangsmaade.

Botanikerne have siden Ehrenbergs og Kützings Tid anvendt Renkulturer til udviklingshistorisk-morfologiske Undersøgelser og strængt gjennemført Principet een Celle som Udgangspunkt; til

denne Retning hører Hansen, men han er tillige den eneste, som ogsaa ved fysiologiske Undersøgelser, hvor Maalet for Renkulturen er at erholde en Massekultur, har fastholdt det samme Princip. Dette er derimod, som vi ovenfor have set, ikke Tilfældet med Pasteur, Koch og den af dem uddannede kemiske og medicinske Skole. Ogsaa disse anerkjende theoretisk naturligvis Principet een Celle som Udgangspunkt, men i Virkeligheden arbejde de, da deres Udgangspunkt ikke er sikret, noget paa Maa og Faa.

Denne Oversigt har altsaa i korte Træk vist os, hvorledes det samme Princip, Benyttelsen af Individet eller den enkelte Celle som Udgangspunkt, ganske vist i lange Tider har været anerkjendt. Dette Princip er imidlertid af de forskjellige Forskere blevet fulgt med større eller mindre Konsekvens, ja, man kan endog godt sige, at der har været Perioder, hvor end ikke en Stræben henimod et saadant Udgangspunkt har været tilstede, idet flere af de Forskere, som have beskjæftiget sig med Udarbejdelsen af Methoder til Rendyrkning af Mikroorganismer, lagde Hovedvægten paa at naa til et Resultat ad den letteste og korteste Vej for derved at undgaa det ofte besværlige Arbejde og de store Fordringer, som en saadan Undersøgelsesmethode kræver, naar Principet, Individet som Udgangspunkt, konsekvent skal gjennemføres. Begrebet Rendyrkning er i det Hele taget blevet meget misbrugt, idet man har villet lægge mere deri, end der egentlig er, og det er i den nyere Tid meget ofte blevet benyttet for dermed at kaste en vis Glands over Arbejder, der i Virkeligheden vare temmelig indholdsløse. Rendyrkningen er et, ganske vist meget vigtigt, teknisk Hjælpemiddel, men heller ikke mere; først ved den Anvendelse, der gjøres af det, og ved de Resultater, som det giver, naar det benyttes i den videnskabelige Forsknings Tjeneste, først derved faar det en højere Betydning.

Denne Oversigt har endvidere lært os, hvorledes Udviklingen er gaaet for sig Skridt for Skridt, idet den ene Forsker stedse har støttet sig til sin Forgænger; de forskjellige Forskeres Arbejdsmaade og Teknik have derimod været forskjellige.

---

## II. Forsøg over Fejlgrændserne for Kochs Pladekultur.

I det første Afsnit bemærkede jeg henimod Slutningen ved Omtalen af Kochs Pladekulturmethode, at de Renkulturer, som fremstilledes efter denne, vel ofte men ikke altid ere absolute Renkulturer, idet det nemlig har sin store Vanskelighed, for ikke

at sige, at det ofte er umuligt, at adskille de enkelte Kim baade af Bakterier og af andre Mikroorganismer i Gelatinen ved Rystning, hvilket vel beror derpaa, at den dem omgivende gelatinøse Masse binder dem sammen.

Allerede i Aaret 1883 underkastede Hansen denne Methode en Kontrol, idet han anstillede Forsøg med to sammenblandede Gjærarter, som ved den mikroskopiske Undersøgelse let kunne skjelnes fra hinanden, nemlig Sacch. apiculatus og en Art af den Gruppe, der betegnes som Sacch. cerevisiae; han anbragte denne Blanding i Urtgelatine, som efter Rystning heldtes ud paa en Glasplade. Pladen indeholdt efter 8 Dages Kultur 70 Pletter, som alle undersøgtes, og heraf tilhørte omtrent Halvdelen hver Art, en af disse Pletter viste sig at være en Blanding af begge Gjærarter, saaledes at Sacch. cerevisiae dannede Vegetationens øverste Lag, medens Sacch. apiculatus optraadte som en underordnet Indblanding i de underste. De andre Pletter indeholdt hver kun een bestemt Art (E. Chr. Hansen: Om Ascosporedannelsen hos Slægten Saccharomyces, Afsnittet »Methoder«, Meddelelser fra Carlsb. Laborat. II Bd. 2det Hefte, 1883, P. 59). Hansen bemærker endvidere: »Saavidt jeg ved, har hverken Koch eller nogen anden underkastet Methoden en Kontrol som den ovenfor beskrevne, og det er dog egentlig først derigjennem, at man kan erholde Klarhed over Methodens Grændser og Sikkerhed i at anvende den«.[1]) Hansen gaar da nærmere ind paa det Spørgsmaal, hvorledes man skal kunne undgaa de urene Vegetationer, der som truende Undtagelser dog virkelig indfinde sig. Den mikroskopiske Undersøgelse kan kun hjælpe i de enkelte Tilfælde, hvor Gjærformen er saa karakteristisk, at den med Lethed kan kjendes. Faren for Fejltagelser indskrænkes naturligvis i samme Grad, som den ønskede Art er tilstede i Overvægt, ligesom ogsaa hvis man gjentager Forsøget saaledes, at det første bliver Udgangspunkt for det andet og dette for det tredie osv., men den fuldt betryggende Sikkerhed faar man dog ikke ad den Vej, man

---

[1]) Senere har imidlertid P. Miquel udført en saadan Kontrol for Bakteriernes Vedkommende, idet han ved Hjælp af en Platintraad overførte Udsæd i Kjødvandspepton fra 100 Kolonier i en Pladekultur, som stammede fra en Luftanalyse, og ved paafølgende mikroskopiske Undersøgelse konstaterede, at der af disse 100 Kolonier havde udviklet sig 134 forskjellige Organismer. Fejlen var altsaa i dette Tilfælde betydelig (Dixième mémoire sur les poussières organisées de l'air et des eaux; Annuaire de Montsouris, 1888. Ref. i Centralblatt f. Bakteriologie u. Parasitenkunde, Bd. IV, 1888, P. 278).

opererer her bestandig med Heldet og har ingen Kontrol, hvorved man kan afgjøre, om man har naaet Maalet eller ej. Betingelserne for at man skal kunne opnaa Renkulturer i Gelatinen ere, at Cellerne blive tilstrækkeligt adskilte fra hverandre, deres Antal i Gelatinen maa derfor ikke være for stort, derimod er det aldeles ikke nødvendigt, at Cellerne blive jævnt fordelte i denne. Hansen slutter saa sine Bemærkninger om denne Sag med de Ord: »Den eneste Vej, ad hvilken vi kunne erholde fuldstændig Sikkerhed for, om en Vegetationsplet er dannet af een eller af flere Celler, er den, at foretage Dyrkningen i et fugtigt Kammer«. Det er denne Fremgangsmaade, som han siden 1883 har anvendt.

For Bakteriernes Vedkommende vil man i mangfoldige Tilfælde slet ikke kunne anvende Hansens Methode, her vedbliver altsaa Kochs Methode at være den bedste. For Gjærcellers og andre lignende Mikroorganismers Vedkommende stiller Sagen sig derimod anderledes, der er Hansens Methode paa Grund af den Sikkerhed, den giver, absolut at foretrække. Men den frembyder ganske vist ved sin Udførelse større Vanskeligheder, og dette er en af Grundene til, at den kun bliver almindelig benyttet af Botanikere og Gjæringsfysiologer, men kun sjelden af medicinske Bakteriologer, ikke engang naar Talen er om Rendyrkning af Gjærceller; en anden Grund er den, at Fejlgrændsen for Pladekulturen hidtil ikke tydelig erkjendtes.

Da Hansens Methode, som ovenfor bemærket, stiller større Fordringer, trænger det Spørgsmaal sig ganske naturligt frem, om den da virkelig er nødvendig. Theoretisk seet maa vi naturligvis strax svare bekræftende herpaa; af egentlige Forsøg, som praktisk kunne vise os Nødvendigheden heraf, foreligger imidlertid kun et eneste, nemlig det af Hansen ovenfor nævnte. Der er derfor al Grund til at underkaste Spørgsmaalet en nøjere Prøvelse, og det er dette, som jeg har gjort i de følgende Forsøg, idet jeg dog af ovennævnte Grunde kun har arbejdet med Gjærceller, ikke med Bakterier.

Ved de Experimenter, som jeg har anstillet her paa Laboratoriet i Løbet af Aarene 1889—90, har jeg for Saccharomyceternes og saccharomyceslignende Cellers Vedkommende kunnet konstatere, at det Tilfælde ikke saa sjældent indtræffer, at en Koloni, som efter det Ydre at dømme (dens runde Form og isolerede Stilling) saavelsom efter en nøjagtig mikroskopisk Analyse synes at bestaa af en enkelt Art, i Virkeligheden ofte i sig indesluttede flere Arter, eller, hvis Undersøgelsen kun var foretaget med en enkelt Art, at en Koloni, om hvilken man maatte antage, at den var opstaaet af en eneste Celle, viste sig at være dannet af to eller flere Celler, hvad der jo med Hensyn til Methoden er det samme.

Naar Talen er om Bakteriekolonier i en Næringsgelatine, da kan ofte Formen eller Farven af Kolonien, dens tørre eller slimede Udseende give vigtige Oplysninger og være bestemmende med Hensyn til Bedømmelsen af dens Renhed, for Saccharomyceternes og de gjærlignende Cellers Vedkommende lader noget saadant sig almindeligvis ikke gjøre. Hansen har allerede tidligere nogle Gange omtalt dette og tillige gjort opmærksom paa nogle Former, der i den Henseende danne en Undtagelse, idet deres Kolonier med temmelig Lethed kunne kjendes ved Hjælp af Loupe eller med det blotte Øje, naar de ere fuldstændig brudte igjennem Gelatinelaget (E. Chr. Hansen: Methoder til Fremstilling af Renkulturer af Saccharomyceter og lignende Mikroorganismer; Medd. fra Carlsb. Laborat. II Bd. 4de Hefte, 1886, P. 162, og samme Forfatter: Om Alkoholgjærsvampenes Forhold til Sukkerarterne, ibid. II Bd. 5te Hefte, 1888, P. 225). Naar dertil kommer, at kun meget faa Arter af Gjærceller have en saadan Form, at de under Mikroskopet kunne skjelnes fra andre Arters Celler, er der kun een Fremgangsmaade, som kan anvendes, naar man vil gjøre Forsøg paa at bestemme Fejlgrændsen ved Kochs Pladekultur-Methode, hvis man ikke netop arbejder med en saadan let kjendelig Form, saaledes som ovenfor angivet ved Hansens Kontrolforsøg i 1883, og det er strax efter Spredningen i Næringsgelatinen at undersøge de enkelte Cellers Plads og ved Hjælp af et eller andet Apparat at mærke sig deres indbyrdes Stilling. Det er denne sidste Fremgangsmaade, jeg har fulgt i nedenstaaende Forsøg.

Denne Prøve er skarpere og fuldstændigere end den af Hansen anvendte, idet man ved den sidstnævnte altid er udsat for at faa et gunstigere Resultat end det virkelige, man vil f. Ex. ofte slet ikke være istand til at opdage Indblandinger i Pletterne. Dette vil saaledes ogsaa kunne blive Tilfældet, hvis man anstiller Forsøget med den af Hansen benyttede Blanding af Sacch. apiculatus og Sacch. cerevisiae, idet jo ikke alle Cellerne af førstnævnte Art ere citronformede.

Saavel Forberedelserne til som selve Fremstillingen af Renkulturen og den derpaa følgende Kontrol er tidligere angivet af Hansen i hans ovenfor nævnte Afhandling i Carlsberg Laboratoriets Meddelelser, II Bd. 4de Hefte, P. 155—162, til hvilken udtømmende Fremstilling jeg derfor vil henvise og kun kort berøre selve Hovedtrækkene deraf, det er nemlig denne Methode, som jeg ogsaa har anvendt ved mine efterfølgende Undersøgelser.

Gjæren, som benyttedes, bestod ved nogle af Forsøgene af unge, kraftige Celler fra Gjæringens Begyndelse, ved andre derimod

af Gjærceller tagne ved Gjæringens Slutning, altsaa ældre og mindre kraftige Individer. Til Forsøgene anvendtes forskjellige Bryggeri-Undergjærarter, nemlig: Carlsberg Undergjær Nr. 1, Carlsberg Undergjær Nr. 2, Sacch. cerevisiae I Hansen (Overgjær fra Edinburg), en belgisk Overgjær, desuden en Sacch. Pastorianus, Sacch. exiguus, Sacch. membranaefaciens Hansen, Mycoderma cerevisiae, Sacch. apiculatus og smaa, runde gjærlignende Celler fra Surdejg; de sidste lignede Sacch. minor Engel, men dannede ikke Ascosporer. Det var dels hver Art for sig, dels Blandinger af flere Arter, som bleve benyttede.

Lidt af denne Gjær udrørtes i en Kolbe med steriliseret Vand, og efter kraftig Omrystning førtes ved Hjælp af et Platintraadstykke en yderst ringe Mængde af Vædsken med Gjærblandingen over i en Kolbe med flydende Urtgelatine (ved ca 33° C.). Omrystningen i Vandet tjener ikke blot til at fortynde Gjæren, men tillige ogsaa til saavidt muligt at skille Cellerne ad, for at Prøven ogsaa i den Henseende kan blive anstillet under saa gunstige Omstændigheder som muligt. Efterat Gelatine-Kolben var omrystet i nogen Tid for at opnaa en jævn Fordeling af Cellerne i Gelatinen, overførtes en passende Mængde af denne paa Dækglas (30 Millimeter i Diameter), der, efter at Gelatinen var stivnet, anbragtes paa de fugtige Kamres Glasringe. Saasnart disse Kamre vare færdige, undersøgtes de saa hurtigt som muligt, idet jeg ved Hjælp af Objektmærkeren (Objectmarkirer, Klönne & Müller, Berlin) omgrændsede forskjellige Partier, undersøgte og talte Cellerne i disse og aftegnede det hele (Cellernes Stilling osv.) paa Papir til senere Kontrol efter henholdsvis 1 og 2 Dages Forløb. Ved Hjælp af den omtalte Objektmærker afsættes paa Dækglasset en Ring, hvis Diameter er omtrent 0,5 Millimeter, det vil sige, der afgrændses et Parti af Gelatinen, som akkurat svarer til et Synsfelts Størrelse, naar Objektiv IV og Okular I (Seibert) benyttes; man kan altsaa overse det hele uden at flytte Præparatet, og ved forskjellige Indstillinger kan ethvert Lag i Gelatinen nøjagtig undersøges. Det er nødvendigt at undersøge Kamrene saa hurtigt som muligt, efter at Gelatinen er stivnet, inden Cellerne endnu have begyndt at danne Knopper. Hvis man har flere Kamre i Gang, gjør man derfor bedst i at anbringe dem, som man ikke strax har Lejlighed til at undersøge, ved en lav Temperatur; jeg stillede dem derfor altid i et Isskab ved ca 3° C. Her foregaar der ingen Udvikling, og det synes, som om Cellerne ikke svækkes videre ved denne Behandling, selv under et Ophold her fra den ene Dag til den anden; et af mine Forsøg peger i

alle Tilfælde hen derpaa. Et kort Ophold her har, som det viste sig, i ethvert Tilfælde ingen synlig Indflydelse.

Ved Undersøgelsen af Cellerne og de senere hen dannede Kolonier tog jeg Hensyn til følgende forskjellige Forhold: Celler med tydelige Knopper bleve regnede for enkelte Celler, og hvorsomhelst der var mindste Tvivl om, hvorvidt det, jeg havde for mig, var to Celler, som berørte hinanden, eller en Celle med udvoxet Knop, regnede jeg dem for een Celle eller medtog dem slet ikke i Beregningen. Hvis to Celler laa hinanden saa nær, at de vilde være smeltede sammen til een Plet, om de begge havde været i Stand til at udvikle Kolonier, eller hvis blot den ene af dem havde udviklet en saadan, men ingen af disse Celler viste Tegn til Liv i Gelatinen, lod jeg ogsaa disse være udenfor Beregningen med Hensyn til det stillede Spørgsmaal. Naar to Pletter kun delvis smeltede sammen, men de ved en svag Forstørrelse endnu kunde skjelnes som to selvstændige Kolonier, regnedes de for to. Kun hvor jeg efter to Døgn ved ca 22° C. med Sikkerhed fandt, at to eller flere Celler tilsammen havde dannet en eneste Koloni, hos hvilken der ikke var Spor af, at en Sammensmeltning af to eller flere Pletter havde fundet Sted, men Kolonien derimod saa ud, som om den kunde være dannet af een eneste Celle, kun disse Tilfælde bleve under Optællingen opførte som Fejl. Jeg har saaledes i mine Beregninger af de Fejltagelser, som Kochs Pladekultur kan medføre, ikke faaet for stort et Procentantal, snarere et for lille.

At jeg valgte to Døgn som et passende Tidspunkt for min Undersøgelse ligger deri, at man først da som Regel har tilstrækkelig store Kolonier[1]). De kunne nu, idetmindste i Reglen, tydeligt

[1]) Det er praktisk at anbringe en Draabe Vand i Bunden af Kamrene, fordi Kolonierne da udvikle sig kraftigere, blive større, end naar man undlader dette; men dette kan føre en Ubehagelighed med sig, idet der da stundom paa Dækglassets nedadvendte Flade samler sig smaa Vanddraaber dels langs Gelatinens Rand og dels paa denne, saaledes at Kolonierne derved kunne bringes til at flyde sammen og Forsøget altsaa mislykkes. Dette forhindres bedst, ved at man sørger for, at der er fugtig Luft baade udenfor og indenfor Dækglasset, altsaa at man dels anbringer Vand i Bunden af Kamrene og dels stiller disse under en fugtig Klokke, førend de sættes ind i Thermostaten ved ca 22° C. Det har imidlertid en Ulempe, naar man til Mærkningen af Cellerne anvender Klönne & Müllers Farvevædske, denne flyder nemlig ud i fugtig Luft, og Ringene udslettes. Jeg benyttede derfor en anden Farve, idet jeg opløste Fuchsin i Anilinolie og dertil satte Kanadabalsam, som var opløst i Xylol. Ringen,

ses med blotte Øjne, naar Urtgelatine anvendes som Næringssubstrat, og en Overførelse fra dem ved Hjælp af Platinnaal i den Næringsbund, hvori man fremdeles maatte ønske at dyrke dem, kan da let ske. Et længere Ophold ved denne Temperatur vil give et større Antal Sammensmeltninger. Set fra dette Synspunkt giver min Fremgangsmaade altsaa ogsaa kun Oplysning om den lavere Grændse for Fejltagelserne, som Pladekulturen fører med sig. At jeg gjorde mig al mulig Umage for, at Spredningen af Cellerne i Gelatinelaget kunde blive saa fuldstændig som mulig, er en Selvfølge.

Jeg kan paa dette Sted ogsaa bemærke, at de fleste Forsøg bleve udførte med den af Hansen ligeoverfor Saccharomyceter og gjærlignende Celler almindelig anvendte Urtgelatine (Urt med Tilsætning af 5—6 % Urtgelatine). Kun i ganske enkelte Tilfælde benyttedes i bestemt Øjemed andre Næringsgelatiner, f. Ex. den af Koch ligeoverfor Bakterier almindelig anvendte Kjødvandspeptongelatine, herom imidlertid senere.

Det Tilfælde indtraf imidlertid ikke saa sjældent, at kun den ene af to ved hinanden liggende Celler dannede en Koloni, og at denne under sin Væxt nærmede sig den anden Celle og inden Udløbet af de to Døgn indesluttede den i sig. Om denne anden Celle vide vi intet, den er maaske død, maaske kun i en saa svækket Tilstand, at den ikke har kunnet udvikle sig i Gelatinen, som i sligt Tilfælde er en daarlig Næringsbund. I første Tilfælde har det naturligvis ingen Betydning, om den tages med ved Overførelse af Pletten eller en Del af denne til det Næringssubstrat, hvori man ønsker at fortsætte Dyrkningen; i sidste Tilfælde er det derimod ikke aldeles uden Betydning, idet nemlig denne svækkede Celle i ovennævnte Vædske kan finde en fortrinlig Næringsbund og altsaa trods Konkurrencen godt kan begynde en Knopskydning, og vi saaledes — saafremt denne Celle hører til en anden Art — begynde at arbejde ikke med en Renkultur, men med urent Materiale, hvilket kan have uberegnelige Følger.

Min Fremgangsmaade var altsaa kortelig følgende. Jeg mærkede mig et bestemt Antal Celler, af disse var der næsten altid — paa et enkelt Forsøg nær — nogle, som efter to Døgn ikke havde

---

som frembringes ved denne Farve, flyder ikke ud, men der er paa den anden Side en lille Ulempe derved, nemlig den, at Farven tørrer saa hurtigt ind paa den Farvepude, hvorpaa man farver Objektmarkereren, at man maa overstryge Puden med Farve hver Gang, man benytter Objektmarkereren.

udviklet Knopper og dannet Kolonier, disse bleve trukne fra, og de af Resten af de mærkede Celler dannede Koloniers Antal noteredes, heraf beregnede jeg saa Forholdet for 100 Koloniers Vedkommende. Saaledes blev der i Forsøg 1. mærket 63 Celler, af hvilke 14 ikke udviklede sig, af de andre 49 Celler opstod kun 44 Kolonier, 100 Kolonier vare altsaa i dette Forsøg dannede, ikke af 100, men af 111 Celler. Angaaende Forholdet mellem udviklingsdygtige og ikke udviklingsdygtige Celler skal jeg paa et andet Sted i denne Afhandling gjøre en lille Meddelelse.

Jeg bemærkede ovenfor, at efter to Døgn vare mange af Kolonierne saa store, at de kunde ses tydeligt med blotte Øjne, alle ere det imidlertid ikke, hvilket ogsaa fremgaar af de senere i Afhandlingen ved Omtale af de forskjellige Gelatiner angivne Maal. Man kan derfor ikke slutte ved direkte Maalinger, hvorvidt Celler, som ligge i en vis Afstand fra hverandre, efter to Døgn ved Udvikling af deres respektive Kolonier ville danne een Plet eller ikke. Stundom havde Celler, som laa i en Afstand af 17.8 $\mu$, 28.4 $\mu$, ja endog 44.0 $\mu$ ($\mu = \frac{1}{1000}$ Millimeter) fra hinanden, og som begge dannede Kolonier, efter to Døgn dannet en eneste aldeles rund Koloni, medens derimod Celler, hvis Afstand kun var 7.1 $\mu$, efter to Døgn ikke havde dannet saa store Kolonier, at disse berørte hinanden med deres Rande. Forholdet bliver atter et andet, hvis kun den ene Celle danner en Koloni, den anden derimod ikke. Ere endelig forskjellige Gjærarter blandede sammen, af hvilke nogle eller maaske alle bestaa af Former med smaa Celler, f. Ex. Sacch. exiguus eller Sacch. apiculatus, maa disse Arters Celler, da de af dem udviklede Kolonier gjennemgaaende ere smaa, nødvendigvis ligge hverandre saa meget nærmere, hvis deres Kolonier skulle kunne smelte aldeles sammen.

Koloniernes Størrelse afhænger — under Forudsætning af, at det er en bestemt Næringsgelatine som benyttes — dels af, hvorvidt der i Bunden af det fugtige Kammer er anbragt en Vanddraabe eller ej, i sidste Tilfælde blive, som ovenfor bemærket, Kolonierne gjennemgaaende mindre, dels maaske ogsaa ofte af Gjærcellernes Plads i Gelatinen, idet Kolonier, som ligge paa Overfladen eller meget nær ved samme, hurtigere ville brede sig end Kolonier, der ligge dybere. Dog er det ikke altid Tilfældet, at Kolonier paa Overfladen brede sig, man ser stundom, at disse voxe op i en Kegle, ofte med krummet Spids[1]), et Forhold, som ikke er sær-

[1]) Peters anfører i sin Afhandling om Surdejgen (W. L. Peters, Die Organismen des Sauerteiges und ihre Bedeutung für die Brot-

egent for nogen enkelt Art, men findes hos flere baade Saccharomyceter og Ikke-Saccharomyceter. Endelig kan Koloniernes Størrelse afhænge af Gjærcellens Art, idet, som før bemærket, visse smaa Former have Tilbøjelighed til at danne smaa Kolonier, men ikke alle smaa Celler give smaa Kolonier.

Vi have nu gjennemgaaet Fremgangsmaaden ved Forsøgene, set, hvorledes de fugtige Kamre skulle behandles, hvorledes Cellerne bleve mærkede, og hvorledes saavel disse som Kolonierne, efter 2 Døgn, bleve undersøgte, hvilke Celler der toges med i Beregningen og hvilke ikke. Vi have endvidere meddelt, at Størrelsen af Kolonierne kunde variere paa Grund af forskjellige Forhold, saa at man ikke ved Beregning i Forvejen kan slutte sig til, hvilke Kolonier der ville smelte sammen og hvilke ikke. Vi komme nu til Hovedopgaven for vore Undersøgelser, nemlig Spørgsmaalet om, hvor store de Fejl ere, som kunne opstaa ved Benyttelsen af Kochs Pladekultur-Methode.

Jeg har i nedenstaaende Tabel anført Resultatet af de 23 Forsøg, som jeg i den Hensigt anstillede, og tillige ved hvert enkelt af disse angivet, med hvilke Gjærarter, de ere blevne udførte:

| Forsøg | | 100 Kolonier dannede af | |
|---|---|---|---|
| 1. | Carlsberg Undergjær Nr. 1 | 111 | Celler. |
| 2. | do. do. | 106 | - |
| 3. | do. do. | 104 | - |
| 4. | Carlsberg Undergjær Nr. 2 og Sacch. apiculatus | 135 | - |
| 5. | do. Nr. 1 | 111 | - |
| 6. | do. do. | 103 | - |
| 7. | do. do. | 110 | - |
| 8. | do. Nr. 2 og Sacch. exiguus | 107 | - |
| 9. | do. do. og do. | 108 | - |
| 10. | do. do. og do. | 112 | - |
| 11. | do. do. og do. | 105 | - |
| 12. | Carlsberg Undergjær Nr. 1 | 104 | - |
| 13. | Sacch. cerevisiae I. Hansen | 108 | - |

gährung; Botan. Zeit. Nr. 25—26—27, 47de Aarg., 1889) som noget karakteristisk for den af ham heri fundne Saccharomycet (S. minor Engel), at dens Kolonier paa Gelatine dannede kegleformede ofte krummede Fremragninger. Ved Undersøgelse af Surdejg har jeg i flere forskjellige Prøver fundet en Form, som i Størrelse og Udseende aldeles passede paa den af Peters beskrevne, og som ligeledes dannede disse kegleformede Kolonier, men den udviklede aldrig Endosporer og var altsaa ingen Saccharomycet. Man finder ikke sjælden, f. Ex. hos Carlsberg Undergjær Nr. 1, lignende kegleformede Kolonier.

| Forsøg | | 100 Kolonier dannede af |
|---|---|---|
| 14. | Carlsberg Undergjær Nr. 1 .................... | 105 Celler. |
| 15. | Sacch. apiculatus og Sacch. exiguus ............ | 114 - |
| 16 | do. do. ............ | 105 - |
| 17. | do. do. og Mycod. cerevis. | 109 - |
| 18. | Sacch. exiguus og Mycod. cerevisiae ........... | 118 - |
| 19. | Sacch. exiguus, Sacch. apiculatus og Mycod. cerevis. | 111 - |
| 20. | Belgisk Overgjær, Sacch. Pastorianus og Mycod. cerevisiae ............................ | 100 - |
| 21. | Sacch. Pastorianus og Sacch. membranaefaciens | 109 - |
| 22. | Carlsberg Undergjær Nr. 2 og smaa runde Gjærceller | 102 - |
| 23. | Carlsberg Undergjær Nr. 2 .................. | 107 - |

Hvilke Resultater kunne vi udlede af disse Forsøg? Kochs Pladekulturmethode anvendt lige overfor Gjærceller har kun i 1 af 23 Tilfælde givet os fuldstændige Renkulturer, nemlig i Forsøg 20, hvor alle de mærkede Celler laa saaledes, at ingen af de Pletter, der dannedes af disse, smeltede sammen; 100 Kolonier vare altsaa dannede af 100 Celler, i intet af de andre Forsøg var dette Tilfældet. Mine ovenstaaende Forsøgsrækker lære os, hvor hyppigt der kan begaas en Fejl, idet efter disse Prøver omtrent kun 4—5 % af de Koch'ske Pladekulturer give helt tilfredsstillende Resultater, nemlig saaledes, at enhver af Pladens Kolonier indeholder en absolut Renkultur. Hvor stor denne Fejl kan være, viser os Fors. 4, her ere 100 Kolonier dannede af 135 Celler; som Gjennemsnitstal af alle mine Forsøg faas, at 100 Kolonier ere dannede af 108 Celler. Sikre kunne vi paa denne Maade aldrig være, vi vide i Virkeligheden ikke, hvornaar vi have en Renkultur og hvornaar ikke; som jeg tidligere har bemærket, det sikre Udgangspunkt mangler.

Paa et andet Sted i denne Afhandling har jeg omtalt, at der til nogle af Forsøgene blev anvendt unge, kraftige Celler fra Gjæringens Begyndelse, til andre derimod Gjær fra Gjæringens Slutning. Dette har ogsaa, som vi nu skulle se, en omend mindre Betydning med Hensyn til de Fejltagelser, som kunne begaas ved den Kochske Pladekulturmethode. Jeg lagde Mærke til, at ved et enkelt Forsøg, som blev anstillet med Sacch. apiculatus og Sacch. exiguus (Fors. 15), der begge dannede meget smaa Kolonier, fandt der desuagtet temmelig hyppigt en Sammensmeltning af Kolonierne Sted (100 Kolonier — 114 Celler). Grunden hertil var heller ikke den, at Cellernes Antal i Gelatinen var saa stort, at disse overalt laa tæt opad hverandre, tvertimod. Det gjaldt jo netop om ved disse Forsøg at fremstille Pladekulturer, som tilfredsstille de For-

dringer, Koch og hans Skole stiller. Grunden kunde altsaa, da Kolonierne vare smaa. da deres Antal ikke var for stort, og da disse vare jævnt fordelte i Gelatinen, kun være den, at Cellerne hos disse Arter vanskeligt skilles fra hverandre under Fordelingen i Gelatinen. Gjæren var i dette Forsøg for begge Arters Vedkommende taget fra Gjæringens Begyndelse. I et følgende Forsøg (Fors. 16) med de samme Gjærarter, men denne Gang tagne ved Gjæringens Slutning saas det, at Cellerne her med større Lethed skiltes fra hverandre (100 Kolonier — 105 Celler). Et senere Forsøg (Fors. 18) viste endnu tydeligere end Forsøg 15, hvor vanskeligt Cellerne skilles ad ved Gjæringens Begyndelse. Her var i to fugtige Kamre tilsammen kun udviklet 60 Kolonier, og alle de mærkede Celler dannede Kolonier, der kunde altsaa slet ikke være Tale om, at Cellernes Antal havde været for stort, og dog viste det sig, at 100 Kolonier vare dannede af 118 Celler, at altsaa disse vanskeligt lode sig skille fra hverandre; den indtraadte Fejl var, som det ses, følgelig ret betydelig. Ogsaa disse Celler hidrørte fra Gjær, som var taget lige ved Gjæringens Begyndelse (efter et Døgns Kultur ved 25° C.). Ved nu at undersøge dette Forhold nærmere fandt jeg, at det synes at være ejendommeligt for alle de anvendte Gjærarter, at Cellerne ved Gjæringens Begyndelse vanskeligere skilles fra hverandre end ved Gjæringens Slutning. Tage vi et Middeltal af de Forsøg, der vare anstillede med Gjær fra Gjæringens Begyndelse, faa vi, at 100 Kolonier ere dannede af 110 Celler (største Antal 135, mindste 100), medens vi som Middeltal for Analyserne med Gjær fra Gjæringens Slutning finde, at 100 Kolonier ere dannede af 107 Celler (største Antal 111, mindste 103). Heraf kan man saa atter drage den Slutning, at den Fejl, som begaas ved Anvendelsen af Kochs Pladekultur, bliver mindre, naar Cellerne stamme fra Gjæringens Slutning, end naar de stamme fra Begyndelsen af samme. Man maa imidlertid ikke heraf lade sig forlede til at antage, at Kochs Pladekulturmethode med Celler fra Gjæringens Slutning som Udgangspunkt giver Sikkerhed for Fremstillingen af en Renkultur af Gjær. For det første er nemlig Fejlen, som kan indtræde, ikke ubetydelig, og for det andet kan man som Regel af rent praktiske Grunde ikke anvende ovennævnte Tidspunkt i Gjæringen som Udgangspunkt, hverken naar Talen er om Laboratorieforsøg, eller naar det gjælder om at fremstille Renkulturer til Brug i den store Industri. Som vi senere skulle se, er der nemlig et stort Procentantal af Celler, som ikke komme til Udvikling, naar Gjæren tages fra Gjæringens Slutning, ligesom ogsaa Kulturgjæren

paa dette Tidspunkt i Almindelighed ikke er tilstede i Overvægt i den urene Bryggerigjær, af hvilken vi maatte ønske at fremstille den i Renkultur. Man vil altsaa som Regel netop være henvist til at benytte Gjæringens Begyndelse som Udgangspunkt, det vil sige, at arbejde under de for Pladekulturen mindst gunstige Forhold.

---

## III. Nogle mindre Undersøgelser, som ere fremkomne under Udarbejdelsen af Afhandlingens Hovedspørgsmaal.

Der er endnu nogle Forsøg med dertil knyttede Resultater, som jeg vil omtale i denne Afhandling, uagtet de staa i en mere eller mindre løs Forbindelse med det Foregaaende. Der trængte sig nemlig ganske naturligt under Arbejdet med Hovedopgaven endel Spørgsmaal frem, som i alle Tilfælde tildels kunde behandles samtidig med Besvarelsen af denne. Forsaavidt dette kunde lade sig gjøre, medtog jeg ogsaa disse mindre Opgaver under mine Forsøg og skal her kortelig meddele de Resultater, hvortil jeg er kommen. Der var særlig to Spørgsmaal, som jeg havde min Opmærksomhed henvendt paa. Det første var dette: Hvorledes forholder det sig med Antallet af udviklingsdygtige Celler i Urtgelatinen, eftersom den Gjær, der benyttes til Renkulturen, tages fra Gjæringens Begyndelse eller fra dens Slutning? Det andet drejer sig om de forskjellige Næringsgelatiners Forhold til Gjæren: Kommer der et større Procentantal Celler til Udvikling, og give disse Celler større Kolonier i Urtgelatine end i de andre almindelig anvendte Næringsgelatiner, eller hvorledes er Forholdet?

Vi ville nu se lidt nærmere paa det første Spørgsmaal. Det er jo en bekjendt Sag, at Gelatiner i Sammenligning med Vædsker i mange Tilfælde ere daarligere Næringssubstrater særlig ligeoverfor Bakterier og Gjærceller, der af en eller anden Grund ere svækkede. Dette er ofte paavist saaledes f. Ex. af Miquel i den tidligere nævnte Afhandling (Annuaire de Montsouris, 1888). Her paa Laboratoriet er det navnlig for Gjærcellernes Vedkommende ligeoverfor Urtgelatinen ligeledes bleven konstateret. Gamle, indtørrede Celler og Sporer af Saccharomyceter, som havde været opbevarede c. 1 Aar i Filtrerpapirspræparater, gav hurtigere Gjæring i Urt end de tilsvarende Celler udviklede Pletter i Urtgelatine; ligesaa forholdt det sig med Celler af Sacch. apiculatus, som havde tilbragt 3 Aar i Jorden (E. Chr. Hansen: Nouvelles recherches sur la circulation du Sacch. apiculatus dans la nature; Annales des

sciences naturelles. Botanique. T. XI Nr. 3, 1890, S. 185), og som derefter overførtes dels i Urt og dels i Urtgelatine. I Urten optraadte en rigelig Udvikling af Celler af denne Art, i Urtgelatinen kom de slet ikke til Udvikling. Naar man arbejder med Blandinger af Gjærceller, Bakterier og Skimmelarter — altsaa ikke med Renkulturer som i de ovenfor omtalte Tilfælde — vise Urtgelatinens uheldige Egenskaber sig ogsaa, idet de svækkede Gjærceller, som ofte bruge c. 14 Døgn ved 25° C. for at komme til Kræfter og vise Livstegn i Ølurt (Gjæring og Formering), slet ikke ville kunne komme til Udvikling i Urtgelatinen, fordi denne ikke kan opbevares saa længe, uden at Skimmelvegetationer brede sig ud over den, eller Bakterier bringe den til at flyde.

Det følger heraf, at vi ogsaa kunne vente at finde nogen Forskjel mellem det Antal af Celler, som udvikle sig i Urtgelatinen, naar Udsæden er taget fra Gjæringens Begyndelse, hvor Cellerne ere unge og kraftige, og naar den stammer fra ældre og i mange Tilfælde noget svækkede Celler fra Gjæringens Slutning. Mine Undersøgelser have herom givet følgende Oplysning. Forsøgene ere anstillede med Urtgelatine og 2 Døgns Kultur ved c. 22° C.

A. Fra Gjæringens Begyndelse.

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| I Forsøg | 4. | udviklede | 2,3 % af | Cellerne | sig ikke. |
| — | 8. | — | 6,4 - - | — | — |
| — | 9. | — | 10,4 - - | — | — |
| — | 10. | — | 3,3 - - | — | — |
| — | 11. | — | 9,8 - - | — | — |
| — | 12. | — | 5,5 - - | — | — |
| — | 13. | — | 2,8 - - | — | — |
| — | 15. | — | 4,0 - - | — | — |
| — | 17. | — | 7,8 - - | — | — |
| — | 18. | — | 0,0 - - | — | — |
| — | 19. | — | 3,6 - - | — | — |
| — | 21. | — | 2,6 - - | — | — |
| — | 23. | — | 0,0 - - | — | — |

Det vil erindres, at der i Forsøgene blev anvendt flere forskjellige Gjærarter, dels enkeltvis og dels i Blandinger.

Ved Gjæringens Begyndelse er det, som Tabellen viser, et forholdsvis ringe Procentantal af Celler, som ikke komme til Udvikling i Urtgelatine; i et Par Tilfælde var Antallet af ikke udviklede Celler 0, altsaa alle Cellerne udviklede Kolonier, og det største Procentantal af ikke udviklede Celler var 10,4 %. Som Middeltal af de 13 Forsøg faa vi 4,5 %.

### B. Fra Gjæringens Slutning.

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| I Forsøg | 1. | udviklede | 22,0 % | af | Cellerne | sig ikke. |
| — | 2. | — | 24,4 | - - | — | — |
| — | 3. | — | 16,0 | - - | — | — |
| — | 5. | — | 32,8 | - - | — | — |
| — | 6. | — | 29,8 | - - | — | — |
| — | 7. | — | 43,3 | - - | — | — |
| — | 14. | — | 11,5 | - - | — | — |
| — | 16. | — | 24,5 | - - | — | — |

Ved Gjæringens Slutning er der, som Tabellen viser, altid et betydeligere Procentantal af Celler, som under de beskrevne Forhold ikke udvikle sig i Urtgelatine. Dette Tal varierede her fra 11,5 %—43,3 %, og tage vi Middeltallet af de 8 Forsøg, faa vi 25,5 %. Urtgelatinens uheldige Indflydelse paa noget svækkede Saccharomyceter og gjærlignende Celler viser sig altsaa ogsaa her paa en tydelig Maade, dog er denne Næringsgelatine vistnok gunstigere end de fleste andre almindelig anvendte Næringsgelatiner, maaske med Undtagelse af Gjærvandsgelatine med 10 % Dextrose, noget hvorom de følgende Undersøgelser ville give os Oplysning.

Som det vil ses, ere enkelte af Forsøgene ikke medtagne ved ovenstaaende Undersøgelser, nemlig Fors. 20 og Fors. 22, fordi disse ikke bleve anstillede med Urtgelatine som Næringsbund, for Fors. 23 var dette ogsaa kun tildels Tilfældet, men her er dog Resultatet for Urtgelatinens Vedkommende medtaget.

Vi komme nu til det andet af de Spørgsmaal, som jeg under Udarbejdelsen af min Hovedopgave ogsaa havde Opmærksomheden henvendt paa, nemlig hvilken Næringsgelatine der er den bedste for Gjærcellerne. Det er altsaa Spørgsmaalet om Procentantallet af de Celler, som komme til Udvikling, og Størrelsen af de dannede Kolonier, vi skulle beskæftige os med.

Hvad først Procentantallet af de udsaaede Celler, som komme til Knopskydning, angaar, viste nogle faa Forsøg, som jeg har anstillet i den Retning, følgende: I et Forsøg (Fors. 23), ved hvilket der foruden Urtgelatine anvendtes Kochs Kjødvandspeptongelatine med eller uden Dextrose (5 %) og Saccharosegelatine (10 % Saccharose), og hvor Gjæren, som anvendtes, var Carlsberg Undergjær Nr. 2 i ung og kraftig Kultur fra Gjæringens Begyndelse, fik jeg følgende Resultat:

Efter 2 Døgns Kultur ved ca 20° C. havde i

| | | |
|---|---|---|
| Urtgelatine alle Cellerne ɔ: .............. | 100 % | dannet Kolonier |
| Kochs Kjødvandspeptongelatine ........... | 91,3 % | - - |
| Saccharosegelatine ...................... | 86,7 % | - - |
| Kochs Kjødvandspeptongelatine med Dextrose | 30,4 % | - - |

Urtgelatinen gav altsaa det bedste Resultat, idet alle Cellerne udviklede Kolonier, Kjødvandspeptongelatinen med Dextrose derimod det sletteste og, mærkværdig nok, et langt daarligere Resultat end Kjødvandspeptongelatinen uden Dextrose; Grunden hertil vides ikke. Alle Kamrene vare naturligvis blevne ens behandlede, Temperatur og Fugtighed var saavidt muligt den samme. Forsøgsresultatet noteredes efter 2 Døgn, idet nemlig som Regel de Celler, som til den Tid ikke have begyndt Knopskydning i Gelatinen ved 20—24° C, overhovedet ikke formere sig paa denne Maade selv ved lang Henstand. I et andet Forsøg (Fors. 22), hvor der anvendtes Kochs Kjødvandspeptongelatine uden Dextrose, og hvor Udsæden ligeledes bestod af unge, kraftige Celler af Carlsberg Undergjær Nr. 2, blandet med smaa gjærlignende Celler (Torula), begge fra Gjæringens Begyndelse, var der ogsaa et stort Antal Celler, som ikke kom til Udvikling, idet kun 71,4 % af Cellerne dannede Kolonier. Naar vi erindre, at Cellerne stamme fra Gjæringens Begyndelse, og sammenligne Tallet af ikke udviklede Celler nemlig 28,6 % med Middeltallet for vore Forsøg med Urtgelatine, hvilket var 4,5 %, træder Forskjellen jo tydeligt nok frem. Et tredie Forsøg (Fors. 3), ved hvilket der foruden Urtgelatine tillige benyttedes Gjærvandsgelatine med en Tilsætning af Dextrose (10 %), anstilledes med Celler af Carlsberg Undergjær Nr. 1; Gjæren blev her taget ved Gjæringens Slutning, Cellerne vare altsaa ældre og mindre kraftige. Der udvikledes imidlertid et større Procentantal af Celler i Dextrose-Gjærvandsgelatinen end i Urtgelatinen. Forholdet var, at i den førstnævnte havde 92 % dannet Kolonier, i den sidstnævnte derimod kun 84 %. Da Gjæren er taget ved Gjæringens Slutning, viser dette Forsøg Dextrose-Gjærvandsgelatinens Fortrinlighed, den staar i alle Tilfælde i denne Henseende endog over Urtgelatinen, desværre er, som vi strax skulle se, denne Gelatine i en anden Henseende mindre heldig, idet de deri dannede Kolonier ere saa smaa.

Vi komme nu til Spørgsmaalet om Koloniernes Størrelse i de forskjellige Næringsgelatiner. Forsøgene ere de samme som ovenfor ere nævnede. Maalene ere foretagne med Mikrometer ved ligefrem Aflæsning og derpaa følgende Korrektion. Det er altsaa Koloniernes virkelige Størrelse, der angives. Mikroskopet, der benyttedes, var Seibert: Objektiv IV, Okular III og indskudt Tubus.

I Forsøg 23 var Koloniernes Diameter efter 2 Døgn ved ca 20° C.:

| | største | mindste | Middeltal |
|---|---|---|---|
| I Urtgelatine | 95,9 μ | 21,3 μ | 42,6 μ |
| I Kjødvandspeptongelatine | 9,9 - | 5,7 - | 7,1 - |
| I Saccharosegelatine | 18,5 - | 6,4 - | 14,2 - |
| I Kjødvandspeptongelatine med Dextrose | 15,6 - | 10,7 - | 10,7 - |

Urtgelatinen viste sig at være den heldigste, derefter Saccharosegelatinen, saa Kjødvandspeptongelatinen med Dextrose og endelig Kjødvandspeptongelatinen uden Dextrose. 2 Døgn er netop det Tidspunkt, paa hvilket Kolonierne i Urtgelatinen have naaet en saadan Størrelse, at de kunne overføres i det Næringssubstrat, i hvilket man ønsker at fortsætte Dyrkningen.

Efter længere Tids Kultur stiller Forholdet sig anderledes, hvilket nedenstaaende Tabel viser.

Efter 5 Døgns Kultur ved ca 20° C. var Koloniernes Størrelse:

| | største | mindste | Middeltal |
|---|---|---|---|
| I Urtgelatinen | 120,7 μ | 42,6 μ | 56,8 μ |
| I Kjødvandspeptongelatinen | 18,5 - | 10,7 - | 14,2 - |
| I Saccharosegelatinen | 28,4 - | 10,7 - | 17,8 - |
| I Kjødvandspeptongelatine med Dextrose | 142,0 - | 56,8 - | 85,2 - |

Forholdet er nu blevet dette, at Kjødvandspeptongelatinen med Dextrose har de største Kolonier at opvise; Udviklingen i Urtgelatinen og i Saccharosegelatinen har kun været ringe i de 3 sidste Døgn, noget større har den været for Kjødvandspeptongelatinens Vedkommende og overordentlig stærk i Kjødvandspeptongelatinen med Dextrosetilsætningen. I denne sidste udviklede der sig imidlertid, som ovenfor omtalt — uvist af hvilken Grund — kun faa Kolonier (30,4 % af de udsaaede Celler), og dette er maaske en Grund til den Størrelse, de udviklede Gjærpletter fik, idet Ernæringsbetingelserne vare gunstigere; jeg tænker her nærmest paa den større Iltmængde, som kan komme Cellerne tilgode.

I det andet Forsøg (Fors. 22), i hvilket Kjødvandspeptongelatine blev anvendt som Næringssubstrat, var efter 3 Døgn ved 22—23° C. de største Koloniers Diameter kun 17,8 μ, de mindste 5,7—7,1 μ og Middeltallet 14,2 μ. Hvad endelig det tredie Forsøg angaar (Fors. 3), blev Maalinger ikke foretagne her; Kolonierne i Dextrose-Gjærvandsgelatinen vare imidlertid, som tidligere bemærket, gjennemgaaende meget mindre end i den i samme Forsøg benyttede Urtgelatine baade efter 2 og navnlig efter 4 Døgns Kultur ved ca 20° C.; de vare saa smaa, at det selv efter 4 Døgn

næsten var umuligt at foretage Udsæd fra dem i et eller andet Næringssubstrat. Denne Udvikling af meget smaa Kolonier i ovennævnte Næringsgelatine har jeg forøvrigt ofte iagttaget, og Rigtigheden heraf kan jeg altsaa støtte paa mere end dette ene Forsøg.

Hvad iøvrigt de her sidst beskrevne Forsøg angaar, maa jeg bemærke, at de kun give et lille Bidrag, blot ere et Fingerpeg hen i den Retning og altsaa maa optages med en vis Reservation. Bestemmelserne kræve egentlig, for at en nøjagtig Sammenligning skal kunne finde Sted, at der opereres med det samme Antal Kolonier i hvert Kammer, at disse sidste ere af samme Størrelse, og at Næringsgelatinelaget i hvert af dem har den samme Størrelse og Tykkelse. En saadan indgaaende Undersøgelse har jeg imidlertid ikke havt Lejlighed til at foretage.

For saavidt man altsaa kan drage nogen Slutning af disse faa Forsøg, tale de i det Hele taget til Gunst for Urtgelatinen: Store Kolonier, hurtig og rig Udvikling ere de Fordele, som opnaas ved Anvendelsen af dette Næringssubstrat.

Urtgelatinen har endnu en heldig Egenskab, idet nemlig Faren for en Udvikling af mulig indblandede Bakteriekim — naar man arbejder med en uren Vegetation, f. Ex. en almindelig Bryggerigjær, af hvilken man vil fremstille en Renkultur — er meget ringe særlig i Forhold til Kochs Kjødvandspeptongelatine.

Endnu en lille Iagttagelse med en dertil knyttet Bemærkning har jeg at tilføje, inden jeg slutter. Ligesom vi ikke — hvad Hovedresultatet af disse Forsøg have lært os — af Koloniernes fuldstændig runde Form og isolerede Stilling i Gelatinelaget kunne slutte, at en saadan Koloni repræsenterer en Renkultur og ikke er dannet af to eller flere Celler, saaledes kan omvendt det, der under Mikroskopet tilsyneladende viser sig som to delvis sammensmeltede Kolonier, være opstaaet af een Koloni, fra en eneste Celle som Udgangspunkt. Dette Tilfælde iagttog jeg engang under Forsøgene (Fors. 2 med Carlsberg Undergjær Nr. 1). Den med Objektmærkeren mærkede Celle laa isoleret i Ringen. Efter et Døgns Forløb havde den dannet en aldeles rund Koloni, og først paa det andet Døgn viste ovenomtalte Phænomen sig. Cellerne vare rimeligvis brudte gjennem Gelatinelaget og havde ovenpaa dette dannet en større og, i Forhold til den mindre og dybere liggende, excentrisk Koloni.

---

## IV. Oversigt over det Foregaaende.

Naar jeg til Slutning i korte Træk skal gjøre Rede for de Synspunkter, hvorpaa mine Undersøgelser ere byggede, og meddele de Hovedresultater, som Afhandlingen har bragt, vil det blive følgende.

Afhandlingen falder i tre Afdelinger, først en kort historisk Fremstilling af Rendyrkningsmethodernes Udvikling, dernæst Hovedspørgsmaalet, Kochs Pladekulturs Fejlgrændse, og endelig nogle mindre Spørgsmaal, som ere fremkomne under Udarbejdelsen af selve Hovedopgaverne og staa i mer eller mindre løs Forbindelse med disse.

Ved Undersøgelsen af Rendyrkningsspørgsmaalets historiske Udvikling har jeg vist, at det til Grund derfor liggende Princip, Benyttelsen af det enkelte Individ som Udgangspunkt for Undersøgelsen, til alle Tider har været anerkjendt som det theoretisk ene rigtige, men at det i Praxis langtfra altid er bleven fulgt. Endvidere har jeg fremhævet, at Formaalet med Renkulturerne er et dobbelt, alt eftersom de skulle anvendes enten i udviklingshistorisk-morfologiske Øjemed eller til fysiologiske Forsøg, hvorfor ogsaa de Fordringer, der stilles, maa være forskjellige.

Blandt de Botanikere, som have behandlet Spørgsmaalet fra den udviklingshistoriske Side, har jeg først omtalt Kützing (1851), der benyttede en tidligere af Mitscherlich angivet Methode for at undersøge Gjærcellens Udvikling; endnu tidligere end han har Ehrenberg (1821) ved sine Studier over forskjellige Svampe ligeledes benyttet Individet som Udgangspunkt for at undersøge Sporernes Spiring. Senere have Tulasne (1861) og navnlig De Bary (1866) foruden flere andre arbejdet i samme Retning ved deres Undersøgelser over Svampesporers Spiring og de derpaa følgende første Udviklingstrin. Et Skridt videre end ovennævnte Forskere gik imidlertid Brefeld (1875), idet han ikke blot undersøgte den enkelte Spores Spiring og de første Udviklingsstadier, men tillige ved direkte mikroskopisk Undersøgelse forfulgte hele den paagjældende Svamps Udvikling. Hans Fremgangsmaade ved Hjælp af de saakaldte Objektglaskulturer eller ved Benyttelse af fugtige Kamre er udførlig bleven omtalt, og det blev fremhævet, at hans Dyrkninger ikke hele Tiden foregik paa Mikroskopbordet, hvad de heller ikke kunde, men at han med passende Mellemrum foretog en Kontrol for af de forskjellige Iagttagelser at kunne sikre sig den fuldstændige Udviklingscyklus. Ligeledes blev det fremhævet, at disse Undersøgelser ikke altid foretoges med absolute Renkulturer, og at dette heller ikke var

nødvendigt ved den Slags udviklingshistoriske Undersøgelser. Ved saadanne Forsøg ønsker man tvertimod at arbejde med saamange Individer af samme Art som muligt for at faa saa mange Iagttagelser som muligt ud af sine Experimenter — ja, man kan endog godt arbejde uden Renkultur!

Anderledes derimod stiller Forholdet sig, naar Talen er om Experimenter med Massekulturer af en enkelt Art til fysiologiske Forsøg. Her er den direkte Kontrol paa Mikroskopbordet umulig, og man maa anvende andre Methoder end ved den udviklingshistorisk-morfologiske Undersøgelse; de dertil benyttede Methoder ere her nemlig aldeles ubrugelige.

Til sidstnævnte Slags Undersøgelser have de Forskere, som have beskæftiget sig dermed, dels anvendt Vædsker, dels fast Substrat. Vædsker benyttedes saavel ved den fysiologiske Rendyrkningsmethode (bl. a. af Pasteur), som ved den saakaldte Fortyndings- eller Spredningsmethode (Lister, Hansen). Fast Næringssubstrat anvendtes af Schroeter, Koch og den af ham uddannede Skole og af Hansen.

Det, Pasteur (1876) og de Forskere, som have anvendt den fysiologiske Methode til Fremstilling af Renkulturer, lagde til Grund for deres Undersøgelser, er de forskjellige Mikroorganismers forskjellige fysiologiske Egenskaber og navnlig det, at de i forskjellige Næringsvædsker kunne vise en større eller mindre Modstandskraft. Som vi have set, beror det paa et rent Tilfælde, hvorvidt man ved en saadan Fremgangsmaade opnaar en Renkultur eller ej.

Den saakaldte Fortyndingsmethode er først bleven bragt i Anvendelse af Lister (1878) ligeoverfor en Mælkesyrebakterie. Ogsaa hans Fremgangsmaade er udførlig bleven beskrevet. Hvad den gik ud paa var at bestemme under Mikroskopet, hvormange Bakterier der findes i en yderst ringe Mængde ($\frac{1}{50}$ af en Draabe) af Vædsken for derved at blive sat i Stand til at beregne, med hvor stor Mængde steriliseret Vand denne Vædske maatte fortyndes, for at en vis ringe Del deraf kun kom til at indeholde i Gjennemsnit een Kim. En saadan Spredningsmethode bliver, selv om den er kombineret med en Tælning, imidlertid aldrig exakt. Navnlig trænge følgende Spørgsmaal sig frem: Hvorledes kan man faa at vide, at Resultatet virkelig er naaet? Har man et Middel til at adskille de Kolber, som kun ere blevne inficerede med een Celle, fra dem, som trods Beregningen ere blevne inficerede med flere? Disse Spørgsmaal bleve først løste af Hansen (1882), og først derved blev Fortyndingsmethoden exakt. De to nye Momenter,

som Hansen føjede til, ere dels et Middel til en nøjagtig Tælning og dels et Kjendetegn, ved hvilket man kan afgjøre, om vedkommende Kolber efter Infektionen har modtaget een eller flere Celler; kun de Kolber, der vise een Gjærplet, give Sikkerhed for en Renkultur. Denne Methode kan imidlertid ikke anvendes lige overfor Bakterier og er kun anvendt ligeoverfor Gjærceller; ved Hjælp af den fremstillede Hansen sine første Renkulturer. Nu benyttes Fortyndingsmethoderne ved Hjælp af Vædske overhovedet sjældent, efterat Gelatinemethoderne ere komne i Brug.

Vende vi os nu til de Forskere, som have anvendt et fast Næringssubstrat, træffe vi først paa Schroeter (1872), som til Rendyrkning af Pigmentbakterier anvendte Kartoffelskiver, men den, der egentlig uddannede denne Methode videre, var Robert Koch (1881). Den Fremgangsmaade, han først betjente sig af, nemlig ved Indpodningsstriber at fordele Kimene i den stivnede Gelatine, var imidlertid meget ufuldkommen. Koch erstattede derfor ogsaa senere denne Methode med den saakaldte Pladekulturmethode (1883), ved hvilken Kimene fordeles under Rystning i den endnu flydende Næringsgelatine. Det er i Virkeligheden det samme Princip, her anvendes, som tidligere blev benyttet i de ældre Fortyndingsmethoder med Vædsker. For mange Bakteriers Vedkommende er det imidlertid næppe muligt at sikre sig Udgangspunktet; Sandsynligheden for en Renkultur er ganske vist tilstede, men Visheden mangler. Den faas først, naar man fra Begyndelsen af efter Fordelingen af Cellerne i Gelatinen observerer den enkelte Kim og følger dens Udvikling, indtil den har dannet en mikroskopisk kjendelig Koloni.

Dette har Hansen gjort for Gjærcellernes Vedkommende (1883), idet han efter Fordeling af Cellerne i Gelatinen anbringer en Del af denne i et fugtigt Kammer, i hvilket han kan observere de enkelte Celler, markere deres Plads og følge deres Udvikling under Mikroskopet, saaledes at han garanterer sig den Vegetationsplet, som han senere benytter til Fremstilling af en Massekultur. Først derved er Gelatinemethoden bleven en exakt Methode.

Dette er i korte Træk Indholdet af Afhandlingens første Del. Vi have heraf set, hvorledes Botanikerne altid have fastholdt Principet een Celle som Udgangspunkt, medens derimod ingen af de Forskere, som have arbejdet med fysiologiske Forsøg, med Undtagelse af Hansen, have gjort dette, ihvorvel de nok theoretisk have anerkjendt Principets Gyldighed. Begrebet Rendyrkning er i Virkeligheden kun et — ganske vist meget vigtigt — teknisk Hjælpemiddel, men ikke mere, og det er først ved den Anvendelse, der

gjøres af det, og ved de Resultater, som derved opnaas, naar det benyttes i den videnskabelige Forsknings Tjeneste, at det faar en højere Betydning.

Vi komme nu til Afhandlingens anden Hovedafdeling, nemlig selve Forsøgene over Fejlgrændsen for Kochs Pladekultur. At Hansens Methode ved Hjælp af det fugtige Kammer theoretisk set er at foretrække, er indlysende; af praktiske Forsøg, som kunne vise Nødvendigheden af at benytte den, forelaa hidindtil kun det ovenfor omtalte, og dette er Grunden til, at jeg har underkastet Spørgsmaalet en nøjere Prøvelse. Til mine Forsøg har jeg af de ovenfor anførte Grunde kun anvendt Gjærceller, ikke Bakterier. Jeg benyttede flere forskjellige Gjærarter, baade ægte Saccharomyceter og gjærlignende Celler, dels enkeltvis og dels i Blandinger. I nogle Tilfælde blev Gjæren taget i Gjæringens Begyndelse, i andre derimod først ved Gjæringens Slutning.

Mine Forsøg bleve udførte ved Hjælp af fugtige Kamre og efter det samme Princip som i Hansens ovenfor omtalte Rendyrknings-Methode. Kun hvor jeg efter 2 Døgn ved Undersøgelsen af Kamrene fandt, at to eller flere Celler tilsammen havde udviklet en eneste Koloni, hos hvilken der ikke var Spor af, at en Sammensmeltning af to eller flere Pletter havde fundet Sted, men Kolonien derimod saa ud, som om den kunde være opstaaet af en eneste Celle, kun disse Tilfælde bleve under Optællingen opførte som Fejl. Jeg har saaledes i mine Beregninger af de Fejltagelser, som Kochs Pladekultur kan medføre, ikke faaet et for stort, men snarere et for lille Procentantal.

Med Hensyn til Koloniernes Størrelse observerede jeg, at forskjellige Forhold kunne have Indflydelse herpaa, nemlig dels Gjærens Art, dels Koloniens Beliggenhed i Gelatinen og endelig det Forhold, hvorvidt der i det fugtige Kammers Bund er anbragt en Vanddraabe eller ej — alt naturligvis under Forudsætning af, at en bestemt Næringsgelatine, i dette Tilfælde Urtgelatine, benyttedes.

Jeg anstillede ialt 23 Forsøgsrækker, og det deraf uddragne Resultat var følgende. Naar jeg anvendte Kochs Pladekultur ligeoverfor Gjærceller, opnaaede jeg kun i 1 af mine 23 Forsøgsrækker fuldstændige Renkulturer — i dette Tilfælde var nemlig 100 Kolonier dannede af 100 Celler — men i ingen af de andre fandt dette Sted. Der begaas altsaa ved at arbejde efter Kochs Methode hyppigt en Fejl, da omtrent kun 4—5 % af Pladekulturerne fuldt ud gave tilfredsstillende Resultater, saaledes nemlig at enhver af Pladens Kolonier indeholdt

en absolut Renkultur. Den største Fejl, jeg iagttog, var, at 100 Kolonier vare dannede af 135 Celler, og tager man et Gjennemsnitstal af alle Forsøgene faas som Resultat, at 100 Kolonier ere dannede af 108 Celler.

Det viste sig ved flere Forsøg, at Celler, som stammede fra Gjær, der var taget ved Gjæringens Begyndelse, vanskeligere lod sig skille fra hverandre i Gelatinen end Celler af den samme Gjærart, naar Gjæren til Forsøget var taget fra Gjæringens Slutning. Tage vi saaledes et Middeltal af de Forsøg, som vare anstillede med Gjær fra Gjæringens Begyndelse, faa vi, at 100 Kolonier ere dannede af 110 Celler, medens et Middeltal af Forsøgene med Gjær fra Gjæringens Slutning giver 100 Kolonier dannede af 107 Celler. Heraf kan man altsaa drage den Slutning, at den Fejl, som begaas ved Anvendelsen af Kochs Pladekultur, bliver mindre, naar Cellerne stamme fra Gjæringens Slutning, end naar de stamme fra Begyndelsen af samme. Jeg har paa dette Sted i Afhandlingen gjort opmærksom paa, at man ikke af Ovenstaaende maa lade sig forlede til at antage, at man med Sikkerhed kan benytte Kochs Pladekulturmethode med Celler fra Gjæringens Slutning som Udgangspunkt for en Fremstilling af en Renkultur af Gjær. For det første er nemlig, som Middeltallet udviser, Fejlen, der kan indtræde, ikke ubetydelig, og for det andet kan man af rent praktiske Grunde som Regel ikke anvende ovennævnte Tidspunkt i Gjæringens Forløb som Udgangspunkt hverken ved Laboratorieforsøg, eller naar det gjælder om Fremstilling af Renkultur til Brug i den store Industri.

Jeg har, som ovenfor er fremhævet, med Forsæt indskrænket mine Forsøg til Gjærceller alene og har ikke behandlet Spørgsmaalet ligeoverfor Bakterier, da Kochs Methode her i de allerfleste Tilfælde vil være den bedste. At henvise til den store Betydning, som den berømte tyske Forskers Arbejder have faaet i Bakteriologien, turde vel iøvrigt være overflødigt.

Det tredie Afsnit i Afhandlingen omhandler nærmere nogle mindre Undersøgelser, som ere fremkomne under Udarbejdelsen af Hovedspørgsmaalene og tildels behandlede samtidig med disse. Det er navnlig Spørgsmaalene om, hvorledes det forholder sig med Antallet af udviklingsdygtige Celler i Urtgelatinen, eftersom den Gjær, der benyttes til Renkulturen, tages fra Gjæringens Begyndelse eller fra dens Slutning, og hvilken Næringsgelatine der er den bedste for Gjærceller. Hvad den første Undersøgelse angaar, fandt jeg, at i et Par Forsøgsrækker fra Gjæringens Begyndelse udviklede alle de

markerede Celler sig til Kolonier, og at Middeltallet af Celler, som ikke udviklede Kolonier, var 4,5 % fra Gjæringens Begyndelse, men derimod 25,5 % fra Gjæringens Slutning. Med Hensyn til den anden Undersøgelse falder den naturligt i to Dele, nemlig Spørgsmaalet om Procentantallet af de Celler, som danne Kolonier, og Spørgsmaalet om Størrelsen af disse, naar man opererer med forskjellige Næringsgelatiner. Forsøgene anstilledes foruden med Urtgelatine tillige med Kochs Kjødvandspeptongelatine, dels uden, dels med Dextrose (5 %), endvidere med Saccharosegelatine (10 %) og med Gjærvandsgelatine med Tilsætning af Dextrose (10 %). Urtgelatinen stillede sig i det Hele heldigst.

Jeg har endelig til Slutning gjort opmærksom paa, at ligesom man af en Kolonis runde Form og isolerede Stilling kunde være tilbøjelig til at slutte sig til dens absolute Renhed — hvilket ovenstaaende Forsøg have lært os ikke er tilstedeligt — saaledes er omvendt det, der under Mikroskopet ser ud som to delvis sammensmeltede Kolonier, ikke altid at opfatte paa denne Maade; det kan nemlig være opstaaet af een Koloni med en eneste Celle som Udgangspunkt. Dette viser altsaa, hvor udsat man er for at blive skuffet, hvis man af Koloniens Form og Stilling vil slutte sig til dens Renhed, og at man kun har een Udvej for at naa Maalet, den absolute Renkultur, nemlig den at sikre sig sit Udgangspunkt, at begynde sin Renkultur med den enkelte Celle i det fugtige Kammer.

# Hvad er Pasteurs rene Gjær?

**En experimental Undersøgelse**

af

**Emil Chr. Hansen.**

## I.

I de fysiologiske Experimenter, som jeg i Aarene 1879 og 1880 udførte med Saccharomyces apiculatus, fremstillede jeg endnu de nødvendige Renkulturer efter de Principer, der angives i Pasteurs Études sur la bière. Om selve Fremgangsmaaden meddelte jeg følgende[1]: »I et større Antal Kogeflasker med steriliseret Urt som Næringsvædske anbringes Frugter, hvorom man i Forvejen har Grund til at antage, at Sacch. apiculatus findes derpaa, dog kun een Frugt i hver Flaske, og det paases endvidere, at dens Overflade ikke er bevoxet med Skimmelsvampe eller er altfor uren, hvilket Øjet med lidt Øvelse hurtigt opdager. En eller flere af disse Flasker vil i Regelen efter faa Dages Forløb indeholde en yppig og nogenlunde ren Vegetation af den ønskede Gjærsvamp. Om der er nogle Bakterier tilstede har mindre at sige, thi dem vil man som oftest temmelig let faa Bugt med ved Kultur i sure Vædsker. Vanskeligere bliver Forholdet derimod, naar der sammen med Sacch. apiculatus optræder andre Gjær- eller Skimmelsvampe. I saadanne Tilfælde vil det være rigtigst strax at opgive Forsøget og begynde forfra. Har man paa den beskrevne Maade erholdt en brugelig Kultur, saa benyttes denne til Infektion af steriliseret Urt med lidt Vinsyre i en Pasteursk tohalset Kolbe. Efter et Par Dages Forløb er Gjæringen i Gang, og den gamle Næringsvædske

[1]) Emil Chr. Hansen, Om Saccharomyces apiculatus og dens Kredsløb i den frie Natur. (Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet, I Bd. 3 Hefte, p. 318.)

hældes nu fra Gjæren, der ligger paa Kolbens Bund, hvorpaa ny af samme Art sættes til, alt med tilbørlig Forsigtighed, saa at Organismer udenfra holdes borte. Ved at foretage dette nogle Gange kan man tilsidst opnaa en fuldstændig Renkultur.« Jeg kunde, trods Methodens Ufuldkommenhed, udtale mig med en saadan Sikkerhed, fordi den nævnte Art i flere Henseender frembyder meget karakteristiske Kjendemærker. Det er nemlig en af de faa Gjærarter, som vi paa Grund af Cellernes ejendommelige Form kunne bestemme ved en mikroskopisk Undersøgelse alene; hertil kommer, at den i fysiologisk Henseende ogsaa paa flere Maader er ejendommelig. Naar man arbejder med denne Art, er det kort sagt muligt paa ethvert Punkt af Forsøget at udføre en Kontrol, hvorved man kan afgjøre, hvorvidt der er en Renkultur tilstede eller ej. Men Intet af alt dette gjælder om Gjærceller med endogen Sporedannelse, de ægte Saccharomyceter (den eneste Undtagelse herfra ere et Par i den nyeste Tid opdagede Arter), og det var navnlig disse, som jeg paa Grund af deres store theoretiske og praktiske Betydning ønskede at underkaste et indgaaende Studium. Paa dette Omraade var det ikke muligt at komme videre ad de Veje, som mine Forgængere havde vandret. For overhovedet at kunne komme til at begynde paa de Opgaver, jeg havde stillet mig, maatte jeg altsaa først udarbejde en exakt Methode til Fremstilling af de nødvendige Renkulturer. Jeg blev saaledes egentlig mod min Villie tvungen til i Aar og Dag at beskjeftige mig med Studier over denne Gren af den bakteriologiske Teknik; først da jeg havde gjennemført disse, kunde jeg ret tage fat paa de Opgaver, som for mig vare Hovedsagen[1]).

---

[1]) I de ovenfor berørte Undersøgelser gik jeg ud fra det Princip, at man for med Sikkerhed at opnaa en Renkultur maa tage sit Udgangspunkt fra een eneste Celle. Den første Methode, som jeg udarbejdede, var en Fortyndingsmethode med steriliserede Vædsker. Gjæren blev udrørt i Vand, og herfra bleve nøjagtig afmaalte Portioner overførte i Kolber med Urt. Ved Hjælp af et Tælleapparat foretog jeg Udsæden saaledes, at kun et bestemt og temmelig ringe Antal af de sidstnævnte Kolber bleve inficerede. Det Nye i min Methode laa fornemlig deri, at jeg opdagede et Kjendetegn, ved hvilket jeg kunde kjende de Kolber, som hver havde modtaget een Celle, fra dem, der trods Beregningen havde modtaget flere, idet jeg nemlig gjorde den Iagttagelse, at Gjærcellerne, efterat de ved Rystning ere blevne godt fordelte i Urten, lejre sig paa Kolbens Bund og her hver danne sin Gjærplet. Paa denne Maade fremstillede jeg Renkulturerne af de sex Saccharomyces-Arter, som jeg i 1883 indførte i Literaturen, og af flere Bryggerigjærarter. Den første

I mine første Afhandlinger over Alkoholgjærsvampene indskrænkede jeg mig til at meddele de nye Resultater, jeg havde erholdt, og jeg tænkte den Gang slet ikke paa, at det kunde blive nødvendigt at fremdrage mine Forgængeres Fejl og tydeligt at fremhæve, hvori de Fremskridt bestod, som mine Arbejder havde bragt. Mine Modstandere have efterhaanden belært mig om, at den af mig fulgte Fremstillingsmaade er uheldig, naar det gjælder om at skaffe en ny Sag Fremgang. I de senere Aar er jeg paany bleven mindet derom gjennem de Angreb, som fra fransk Side ere blevne rettede imod mig, særlig af Duclaux og Velten.

Duclaux forsøger at vise, at de af Pasteur i det ovennævnte Værk for over 14 Aar siden angivne Methoder til Fremstilling af Renkulturer af Gjærceller gjøre Fyldest[1]). Navnlig dvæler han ved den Fremgangsmaade, som bestaar deri, at man dyrker vedkommende Gjærprøve i en Opløsning af 10 % Saccharose, hvortil der er sat lidt Vinsyre. For at finde Beviser for Rigtigheden af sin Paastand undersøgte han nogle af Pasteurs gamle Kolber, som indeholdt Gjærvegetationer, dels i Ølurt og dels i den nævnte Sukkeropløsning med Vinsyre, og som havde staaet i Pasteurs Laboratorium, siden denne i 1876 opgav disse Studier; nogle vare paa den Tid, da de bleve prøvede, 17 Aar gamle. Ved at under-

---

Meddelelse herom gav jeg i Februar 1882 i Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet, I Bd. 4 Hefte, p. 401 og p. 407, og derpaa i en udførligere Form sammesteds, II Bd. 2 Hefte, p. 51.

Da senere Gelatinen fik en stor praktisk Anvendelse i Bakteriologien gjennem Kochs Arbejder, anvendte jeg ogsaa denne og benyttede ligesom tidligere Ølurt som Næringsvædske. Det viste sig imidlertid, at Cellerne ikke lade sig sprede med den samme Sikkerhed i flydende Gelatine som i Vand og Ølurt; flere af de i en saadan Gelatine udviklede Pletter ere som en Følge heraf ikke dannede af een, men af flere Celler, og man har altsaa ingen Sikkerhed for, at de indeholde en Renkultur. Jeg indførte derfor det fugtige Kammer ved denne Art Rendyrkninger og fremhævede i Modsætning til Koch, at man ogsaa i dette Tilfælde maa tage sit Udgangspunkt fra den enkelte Celle. (Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet, 1883, II Bd. 2 Hefte, p. 61, og II Bd. 4 Hefte, p. 155. Se ogsaa Holms Afhandling: »Om Rendyrkningsmethoderne og særlig om Kochs Pladekultur og dens Fejlgrændse«, Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet, 1891, III Bd. 1 Hefte, p. 1). For Gjærcellernes Vedkommende frembyder min exakte Fremgangsmaade ingen særlige Vanskeligheder, for Bakterierne synes det derimod endnu i mange Tilfælde at være en Umulighed at gjennemføre den.

[1]) E. Duclaux, Sur la conservation des levures. (Annales de l'institut Pasteur, 1889, p. 375.)

søge 19 Kolber fandt Duclaux, at de 14 indeholdt Renkulturer; med Hensyn til de 3 Kolber er han ikke aldeles sikker derpaa, men antager, at ogsaa disse dog hver kun indeholdt eet Species; om 2 Kolber, hvori der fandtes Bryggerigjær, meddeler han, at der i hver var 2 Arter tilstede. Han mener nu, at disse gamle Kolber have vist, at den angivne Rendyrkningsmethode er exakt. Hvis dette var Tilfældet, havde jeg altsaa gjort mig skyldig i en stor Fejltagelse og spildt min Tid med unødvendige Arbejder.

Imod Duclaux's Bevisførelse blev der af Miquel (Annales de Micrographie, 1889, p. 140), A. Jørgensen (Botan. Centralbl., XL Bd. 1889, p. 316) og Denamur (La Gazette du Brasseur, 1889, p. 887) strax rejst den samme vægtige Indvending, nemlig den, at det jo ligefrem er umuligt efter saa lang Tids Forløb at erholde nogen sikker Oplysning om, hvilke Vegetationer de gamle Kolber have modtaget fra Pasteurs Haand. Kolber, som for Øjeblikket kun indeholde eet eneste Species, kunne godt oprindelig have indeholdt flere; vi formaa kort sagt ikke at opdage de Arter, som i Aarenes Løb muligvis ere døde. Naar Duclaux nu endelig ønskede atter at drage de gamle Pasteurske Methoder frem, saa havde det været rigtigere, om han gjennem theoretiske Undersøgelser og praktiske Prøver havde vist os, hvad disse Methoder virkelig formaa. Undersøgelsen af de gamle Kolber giver som sagt i Virkeligheden ingen Oplysning derom. I det Følgende er det min Agt først at meddele en theoretisk Undersøgelse af Methodens Rækkeevne og derefter gjennem Experimenter vise, hvad der derved kan opnaas.

De ovenfor berørte Undersøgelser af Duclaux lære os, at flere Arter kunne leve fredelig sammen i een og samme Kolbe endog i saa langt et Tidsrum som 15—17 Aar. Under saadanne Omstændigheder kan der selvfølgelig slet ikke være Tale om Renkultur, og vi have altsaa her Tilfælde, i hvilke Methoden svigter. Omvendt skal jeg gjerne indrømme min Modstander, at der i Naturen findes Gjærarter, som have en forskjellig Levedygtighed under de angivne Forhold, og hvis der findes en Blanding af saadanne i en Kolbe, vil der naturligvis komme et Tidspunkt, paa hvilket alle de svagere ere døde og kun den stærkeste Art er bleven tilbage. Men Spørgsmaalet er nu: hvorpaa kan man erkjende, naar dette Tidspunkt er kommet, og ved hvilke Kjendetegn kan man med Sikkerhed afgjøre, om man i Kolben har eet eller flere Species. For at Methoden skal kaldes exakt, maa saadanne Fordringer stilles; Oplysninger i den Henseende give imidlertid hverken Pasteur eller Duclaux. Det maa derfor aabent siges, at Methoden alene

af den Grund er højst usikker, og at man ved at anvende den i Virkeligheden arbejder mere eller mindre paa Slump og i Blinde.

Se vi nøjere efter i det citerede Værk af Pasteur p. 224—228, saa finde vi, at han selv har erkjendt Grændserne, og at han selv har vidst, at der kun kunde opnaaes en betinget Sikkerhed paa de af ham den Gang vandrede Veje. For at erholde en Renkultur anvender han derfor heller ikke een bestemt Methode, men flere, og siger, at man i de forskjellige Tilfælde snart maa benytte den ene, snart den anden, og at man overhovedet maa prøve sig frem; en bestemt Regel giver han ikke. Efter at have beskrevet de forskjellige Maader, hvorpaa man kan gaa frem, udtaler han sig saaledes: »Ved disse forskjellige Kunstgreb, hvert for sig eller indbyrdes kombinerede, opnaar man i Reglen at faa den Gjær, som man ønsker at rense, i en meget ren Tilstand«. Om Renkultur i den Forstand, hvori vi nu tage det, er der altsaa slet ikke Tale. Naar han beskriver de Forsøg, som han anstillede med Alkoholgjærsvampe, siger han ogsaa flere Steder i sit Værk, f. Ex. p. 179 og Noten p. 205, at det ikke var ham muligt at afgjøre, om han i hver af sine Kolber havde eet eller flere Species. Pasteur søger at naa sit Maal derved, at han i en Række Kulturer saa vidt mulig begunstiger den Organisme, som han ønsker at beholde ene tilbage, og samtidig dermed søger at hæmme Udviklingen af den eller dem, som han vil fjærne. Ved en saadan Dyrkning kan man naturligvis kun undertrykke de Arter, som under de givne Ernæringsforhold ikke formaa at udholde Konkurrencen med den begunstigede. Men sammen med denne kan der jo godt leve en hel Skare, nemlig alle de, som have nogenlunde samme Ernæringsvilkaar som denne. Principerne for den Art Rendyrkning ere af rent fysiologisk Natur og forudsætte egentlig, at man i Forvejen kjender Ejendommelighederne hos de Arter, med hvilke man arbejder, men da vi jo netop, naar vi ønske at fremstille en Renkultur, i de allerfleste Tilfælde staa overfor de ubekjendte Størrelser, saa er det indlysende, at de herhen hørende Fremgangsmaader som Regel ingen Sikkerhed give. De kunne kun anvendes i saadanne sjeldne Tilfælde, hvor vedkommende Arter ere udstyrede med saa tydelige Karakterer, at de ikke let kunne forvexles med andre, og hvor en Kontrol er mulig. Et Tilfælde af den Slags beskrev jeg i Begyndelsen af denne Afhandling, idet jeg omtalte mine ældre Studier over Sacch. apiculatus.

Efter at have offentliggjort den foran nævnte Afhandling i Annales de l'Institut Pasteur har Duclaux i nogle Foredrag paany udtalt sig om disse Spørgsmaal, nemlig ved den franske Brygger-

kongres i Paris 1889 (Le génie civil, p. 110) og ved Kongressen i Lille 1890 (La Gazette du Brasseur, p. 447, Nr. 141, 1890). Han erkjender her, at min Methode betegner et virkeligt Fremskridt, og at mine Arbejder have fremkaldt en Reform i Bryggerigjæringen. Det Sidste indrømmer han dog kun for Undergjæringens Vedkommende, hvad Overgjæringen angaar kæmper han endnu for Indførelsen af de gamle Pasteurske Methoder paa dette Omraade. Disse Foredrag ere offentliggjorte i Tidsskrifter, som kun læses af en begrændset Kreds, og de Fleste kjende derfor kun hans Opfattelse af Rendyrkningsspørgsmaalene gjennem hans Afhandling i de af ham redigerede Annales de l'Institut Pasteur. Hvis min berømte Collega ogsaa havde offentliggjort sine senere Udtalelser i det sidstnævnte Tidsskrift, vilde jeg, uagtet der ligeledes i disse findes flere urigtige Paastande, maaske kunne have undgaaet atter at beskjæftige mig med disse gamle Sager.

Spørgsmaalet om, hvorvidt min Methode kan anvendes eller ikke i Overgjæringsbryggerier, har faaet sin Afgjørelse i bekræftende Retning, i Danmark ved Alfred Jørgensens Forsøg, i Australien ved De Bavays Forsøg og i den nyeste Tid i Nord-Frankrig og i Belgien ved Forsøg af Kokosinski, Van Laer og Vuylsteke (Station scientifique de brasserie. Comptes-rendus. Gand. 1890, p. 13—21; La Gazette du Brasseur, Bruxelles 1890).

I Frankrig selv er min Methode nu ifølge Kokosinskis Beretning med Held indført i 15 Overgjæringsbryggerier. Dens Anvendelse er altsaa ikke, som Duclaux mener, indskrænket til Undergjæringsbryggerierne.

---

Velten begyndte sine Angreb mod mig i de Forelæsninger, som han holdt ved den franske Bryggeriudstilling i Paris 1887 (Revue universelle de la brasserie et malterie, 1888, Nr. 742 og 743), og gjentog disse paa Kongressen i Antwerpen 1889 (se Beretningen derom p. 82). Han paastaar, at jeg har taget aldeles fejl, idet jeg i Bryggeridriften har indført en Gjær, bestaaende af een eneste Art eller Race; hans Anskuelse er nemlig, at Bryggerigjæren tvertimod skal bestaa af flere, og han udtrykker sig saaledes derom: »Det er Sammenblandingen af disse rene Gjærarter, forskjellige i Henseende til Race og Natur, som bevirker, at Øllet faar den Smag og Bouket, som man ønsker.« Dette paastaar han, at man opnaar ved at anvende Pasteurs Fremgangsmaade, nemlig ved at dyrke Gjæren i en Rørsukkeropløsning, hvortil der er sat lidt Vinsyre, eller i Urt, hvortil der er sat Karbolsyre og Alkohol. En nøjere

Beskrivelse af Fremgangsmaaden giver han ikke i de ovenfor nævnte Forelæsninger, men ved at gaa længere tilbage i Tiden finde vi en saadan i de Forelæsninger, som han holdt ved Verdensudstillingen i Paris 1878. Han har senere udgivet disse under følgende Titel: De la fabrication de la bière par le procédé Pasteur. Conférence faite par Eugène Velten au Congrès international des brasseurs de Paris en 1878 (Revue universelle de la brasserie, Paris 1881, Nr. 372). De findes ligeledes i det Hefte, som Kongressen udgav. Heri siger han: »Naar man til en Sukkeropløsning, der er gunstig for en Udvikling af Alkoholgjæren, føjer en Syre, hindrer man herved Udviklingen af Sygdomsfermenter. Eddikesyrebakterien kan ganske vist leve i en sur Vædske, men for at udvikle sig kræver den en høj Temperatur; de øvrige Sygdomsfermenter leve derimod ikke i en sur Vædske. Til Rensningen af Bryggerigjæren kan man anvende 4—5 % Syre (f. Ex. Vinsyre). Efter 4—5 i denne Vædske udførte Kulturer kan man være vis paa, at Gjæren er ren; Alkoholgjærsvampene blive som de kraftigste og talrigste alene tilbage.« Pasteur, siger Velten, anvender 4 saadanne Kulturer, og hver varer 48 Timer. Ifølge ovenstaaende tilsigtes der altsaa ved denne Rensning af Gjæren kun at fjærne Bakterierne, og der siges, at den saaledes rensede Gjær bestaar af flere Alkoholgjærsvampe.

Kort efterat Pasteur i 1876 havde udgivet sine berømte Studier over Øllet, blev der af afdøde Kaptajn J. C. Jacobsen paa Gamle Carlsberg og af Hr. Carl Jacobsen paa Ny Carlsberg anstillet Forsøg med de deri angivne Fremgangsmaader til Bryggerigjærens Rensning og da ogsaa med de berørte ved Hjælp af Vinsyre og Karbolsyre, men de gave ikke noget gunstigt Resultat og bleve derfor fuldstændig opgivne. Det Samme var Tilfældet i de Bryggerier i Udlandet, hvor lignende Prøver bleve anstillede. Selv i Frankrig fandt Pasteurs Fremgangsmaader ingen Indgang. Velten er for Tiden den eneste Brygger, som anbefaler dem, og han har i hvert Fald ikke til Stadighed arbejdet derefter, hvilket fremgaar af hans egne Meddelelser derom (Wochenschrift für Brauerei, Berlin 1886, p. 5).

Velten har som Pasteurs gamle Medarbejder paa Bryggerivæsenets Omraade et anset Navn; dette har givet hans Angreb, i hvor slet begrundede de end ere, en vis Vægt. Hverken han eller mine andre franske Modstandere have vel opnaaet at bringe Bryggerierne til at optage de gamle Pasteurske Methoder, men de have paa flere Steder opvakt Mistillid mod mig og min Sag og herved bevirket, at den i Frankrig er trængt meget langsommere frem, end det ellers vilde være sket.

Da jeg for otte Aar siden offentliggjorde mine første Meddelelser om Fremstilling af absolute Renkulturer, havde jeg i lange Tider anstillet talrige Forsøg med de ofte omtalte Pasteurske Methoder, men indskrænkede mig til at give en kort theoretisk Redegjørelse i nogle faa Linier, og hermed mente jeg, at den Sag var afgjort. At denne Opfattelse var en Fejltagelse, have som sagt Angrebene vist. Idet jeg mod min Villie er bleven tvungen til paany at beskjæftige mig med disse Spørgsmaal, har jeg strax indset, at jeg, hvis jeg ønskede at faa Ende derpaa, ikke kunde indskrænke mig til en theoretisk Redegjørelse, men at jeg atter maatte anstille Forsøg. Ved disse have D'Hrr. Assistenter Holm og Nielsen været mig behjælpelige, en stor Del af Analyserne ere navnlig blevne udførte af Hr. Holm.

Forsøgene danne to Grupper; den første af disse, som omfatter de fire første Forsøg, har nærmest Hensyn til Spørgsmaalets theoretiske Side; den sidste, hvortil femte og sjette Forsøg høre, har derimod til Hensigt at prøve Veltens Paastande; begge belyse hinanden.

## II.

### Første Forsøg.

En Opløsning af 10 % Saccharose i Vand, hvortil der var sat 1/20 % Vinsyre, blev anbragt i Pasteurs tohalsede Kolber og steriliseret. Efter Afkølingen bleve disse Kolber derpaa inficerede med nedenstaaende Gjærarter i absolute Renkulturer[1]). De anvendte Vegetationer stammede fra 10 Døgns Dyrkning i Urt ved almindelig Stuevarme. Der blev anbragt en temmelig rigelig Mængde Gjær i hver Kolbe og af hver Gjærart omtrent en ligestor Portion.

I A: Sacch. cerevisiæ I, Sacch. Pastorianus I, Sacch. Pastorianus III, Sacch. ellipsoideus II.

- B: Carlsberg Undergjær Nr. 1, Sacch. Pastorianus I, Sacch. Pastorianus III, Sacch. ellipsoideus II.

[1]) En Beskrivelse af de i dette og i de følgende Forsøg omtalte Gjærarter findes i mine tidligere Skrifter »Undersøgelser over Alkoholgjærsvampenes Fysiologi og Morfologi« (Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet 1883—91) og »Untersuchungen aus der Praxis der Gährungsindustrie«. Zweite Ausgabe, München 1890. De tre vilde Gjærarter, Sacch. Pastorianus I, Sacch. Pastorianus III og Sacch. ellipsoideus II fremkalde Sygdomme i Øl, og de bleve derfor netop valgte til disse Prøver.

I C: Carlsberg Undergjær Nr. 1, Carlsberg Undergjær Nr. 2, Sacch. Pastorianus I, Sacch. Pastorianus III, Sacch. ellipsoideus II.

Kolberne bleve derpaa henstillede ved almindelig Stuevarme. Efter en Maaneds Henstand bleve de omrystede, og smaa Gjennemsnitsprøver overførtes i lignende Kolber med den samme Vædske; fra disse blev 1 Maaned senere et nyt Sæt inficeret, og denne sidste Kultur stod derefter atter en Maaned. Ved at overføre saadanne Gjennemsnitsprøver blive de Arter, der maatte være i Overvægt, yderligere begunstigede, og en Renkultur altsaa ogsaa derved forberedt.

Efterat denne Dyrkning havde varet 3 Maaneder ialt, var det Opgaven at bringe de Celler, som endnu maatte være levende, til at udvikle nye Vegetationer og dernæst at udfinde, hvilke Arter der i hver Kolbe vare levende. Fra hver Kolbe blev der i den Hensigt overført Gjennemsnitsprøver i to andre Kolber, hvoraf den ene indeholdt Ølurt og den anden en Opløsning af 10 % Dextrose i Gjærvand. Disse Kolber bleve henstillede ved 25° C., og saasnart der havde udviklet sig en Vegetation, blev der deraf taget Gjennemsnitsprøver til Spredekulturer i Gelatine, hvortil der i det ene Tilfælde var sat Urt, i det andet den omtalte Opløsning af Dextrose og Gjærvand. Kolberne, som indeholdt Resterne af Vegetationen i Urten og i Dextrose-Gjærvand, bleve derpaa henstillede ved almindelig Stuevarme, indtil Hovedgjæringen var standset, hvorpaa der paany toges Gjennemsnitsprøver til lignende Spredekulturer som de forannævnte. Saadanne Spredekulturer bleve ogsaa udførte med Gjennemsnitsprøver, som toges direkte fra de Vegetationer, der havde tilbragt 3 Maaneder under de beskrevne Dyrkningsforhold i Sukkeropløsningen. Prøverne bleve altsaa anstillede med tre forskjellige Udviklingsstadier af vedkommende Gjærvegetation. Gelatinepladerne med de deri udsaaede Gjærceller bleve udsatte for en Varmegrad af 25° C., indtil talrige Vegetationspletter havde udviklet sig deri. Fra disse Pletter blev der derpaa inficeret et større Antal Kolber, som indeholdt Ølurt; desuden bleve Pletterne selv underkastede en mikroskopisk Undersøgelse. De Vegetationer, der udviklede sig i de sidst omtalte Kolber med Urt, bleve ligeledes mikroskopisk undersøgte og overhovedet prøvede for de Karakterer, hvorom jeg i Forvejen vidste, at de fandtes hos vedkommende Gjærarter. Det følger af sig selv, at der bestandig blev anvendt steriliserede Vædsker og Næringsgelatiner, og at der blev arbejdet med en saadan Omhu, at en Infektion udefra ikke kunde finde Sted.

Resultatet blev, at der af de 6 Gjærarter, som ved Forsøgets Begyndelse bleve udsaaede i de 3 Kolber med Opløsningen af Saccharose og Vinsyre, nu kun fandtes 2 Arter i Live, nemlig Sacch. ellipsoideus II og Sacch. Pastorianus I; den førstnævnte havde holdt ud i alle Kolberne, den sidstnævnte kun i een eller maaske i to. Med Sikkerhed kunde Sacch. Pastorianus I kun paavises i een af Kolberne og kun efter Dyrkning i Dextrose-Gjærvandsopløsningen. Sacch. ellipsoideus II havde altsaa under de beskrevne Dyrkningsforhold vist sig som den kraftigste, men ej heller med Hensyn til denne Art gav Methoden Sikkerhed for en Renkultur.

### Andet Forsøg

blev anstillet paa samme Maade som det første, men medens Gjæren i dette stammede fra 10 Døgn gamle Kulturer, blev der derimod nu anvendt helt unge Vegetationer, som vare avlede ved at foretage Dyrkningen i Urt et Døgn ved 25° C. Forøvrigt var Fremgangsmaaden den samme, og Resultatet ved Forsøgets Slutning blev ligeledes det samme.

### Tredie Forsøg

blev væsentlig anstillet som de to foregaaende, men kun med een Kolbe som Udgangspunkt. Udsæden bestod af Carlsberg Undergjær Nr. 1, Sacch. cerevisiæ I og Sacch. Pastorianus III. Forsøgsanordningen adskilte sig fra den, der blev fulgt i de to foregaaende Forsøg, derved, at Dyrkningen i Opløsningen af Rørsukker og Vinsyre kun fandt Sted i Løbet af 4 Uger, og i den Tid blev der paa den beskrevne Maade foretaget 4 Kulturer med omtrent samme Tidsmellemrum. Da det derefter blev undersøgt, hvilke Arter der endnu vare i Live, viste det sig, at dette var Tilfældet med Sacch. cerevisiæ I og Sacch. Pastorianus III. Den førstnævnte af disse kom navnlig frem ved Dyrkning i Ølurt, medens den sidstnævnte Art derimod kun viste sig tydeligt efter en Dyrkning i en Opløsning af Dextrose og Gjærvand. I dette Tilfælde var en Renkultur altsaa heller ikke opnaaet.

### Fjerde Forsøg.

Dyrkningen i Opløsningen af Saccharose med Vinsyre varede i dette Tilfælde 1 Maaned, og der blev i den Tid kun foretaget

een Omheldning, nemlig efter 14 Dages Henstand. Forsøget blev begyndt med 2 Kolber, i hver af hvilke følgende tre Arter bleve indførte, nemlig: Sacch. Pastorianus II, Sacch. Pastorianus III og Sacch. ellipsoideus II. De stammede alle fra livskraftige, men dog 3 Maaneder gamle Vegetationer paa en Næringsgelatine, hvori der var Fiskeafkog og Saccharose. Forøvrig var Forsøgsanordningen aldeles som tidligere. Da Forsøget blev afsluttet, fandtes i begge Kolberne Sacch. ellipsoideus II og kun denne.

De Dyrkningsmethoder, der bleve anvendte for at bringe de Arter, som havde overlevet den beskrevne Behandling i Sukkeropløsningen, til at udvikle Vegetationer og saaledes at give sig tilkjende, ere saadanne, hvorom jeg gjennem en fleraarig Erfaring veed, at de ere gunstige for de nævnte Arter.

Hvis jeg havde sat et endnu større Antal Dyrkninger i Gang og varieret disse paa endnu flere Maader, vilde jeg rimeligvis have havt Udsigt til at faa idetmindste nogle af de Arter frem, der nu syntes at være bortdøde. Hvor Grændsen her er, kan ikke afgjøres. Ogsaa nogle af Pletterne i Gelatinekulturerne kunne hver godt have indeholdt flere end een Art. Det er kort sagt sandsynligt, at der har været flere Arter levende end de, der bleve fundne. De iagttagne maa altsaa nærmest opfattes som de, der have været tilstede i absolut Overvægt. Men selv om vi antage, at de Kolber, i hvilke vi kun fandt een levende Art, ogsaa kun have indeholdt denne, saa bliver Hovedresultatet dog dette, at den beskrevne Fremgangsmaade ikke giver os Sikkerhed for at erholde en Renkultur. Af 9 Kolber indeholdt de 3 ved Forsøgenes Slutning hver 2 Arter; dog blev Behandlingen i de to Forsøg fortsat i Løbet af 3 Maaneder. Paa den anden Side er det ikke usandsynligt, at man ved at gaa endnu længere, vilde have kunnet opnaa, at alle de Arter, hvormed der i et Forsøg blev experimenteret, vilde dø med Undtagelse af en eneste; navnlig gjælder dette i de to første Forsøg om Sacch. ellipsoideus II. Men der er Intet, som kan vejlede os i den Henseende; vi have, som det ovenfor blev fremhævet, intet Kjendetegn at holde os til, ved hvilket vi kunne afgjøre, om Punktet er naaet eller ej, og ved at gaa der ud over, udsætte vi os for, at alt Liv udslukkes. Kort sagt, det er og bliver at arbejde paa Slump og kan aldrig blive en exakt Methode.

Hovedvanskeligheden ved Anvendelsen af den fysiologiske Fremgangsmaade i det nævnte Øjemed er, som jeg allerede har bemærket, den, at vi jo i Forvejen ikke vide, hvorledes de Arter, hvormed vi arbejde, ville stille sig i den nævnte Retning, men selv om vi ogsaa kunde anstille foreløbige Prøver, saa vilde disse

dog ikke under alle Forhold give det samme Resultat. Her vilde nemlig de individuelle Ejendommeligheder hos Arternes Celler ogsaa kunne gjøre sig gjældende, og det er højst sandsynligt, at man, ved gjennem talrige Generationer at udsætte en Art for en saadan Behandling som ovenfor, vil kunne indvirke saaledes paa den, at den efterhaanden bliver mere i Stand til at kæmpe sig frem under de tilstedeværende vanskelige Ernæringsforhold. Dette er et yderligere Bevis for, hvor mangelfulde de fysiologiske Methoder ere i den nævnte Retning.

Den eneste under alle Omstændigheder sikkre Vej, ad hvilken vi kunne opnaa en Renkultur af en Mikroorganisme, lige meget hvilke fysiologiske og morfologiske Egenskaber, den maatte være i Besiddelse af, er at foretage Udsæd af een eneste Celle i et sterilt Næringssubstrat.

### Femte Forsøg.

Dette og det følgende Forsøg bleve anstillede for at prøve den Fremgangsmaade, som Velten i sin foran omtalte Forelæsning beskriver, og som han, efter Pasteurs Anvisning, anvender til Bryggerigjærens Rensning. Vædsken var i dette Tilfælde en Opløsning af 10 % Rørsukker i Vand, hvortil der var sat 4 % Vinsyre. Der blev experimenteret med Vegetationer, bestaaende af unge, kraftige Celler, som bleve avlede ved et Døgns Kultur i Urt ved 26° C., og ligestore Mængder af hver Art bleve indførte i Kolberne.

I A: Sacch. cerevisiæ I, Sacch. Pastorianus I, Sacch. Pastorianus III.
- B: Carlsberg Undergjær Nr. 1, Carlsberg Undergjær Nr. 2, Sacch. Pastorianus I, Sacch. Pastorianus III.
- C: Carlsberg Undergjær Nr. 1, Carlsberg Undergjær Nr. 2, Sacch. Pastorianus I, Sacch. Pastorianus III, Sacch. ellipsoideus II.
- D: Sacch. cerevisiæ I, Sacch. Pastorianus I, Sacch. Pastorianus III, Sacch. ellipsoideus II.

Efterat disse Kolber havde modtaget de nævnte Gjærblandinger, bleve de stillede hen ved almindelig Stuevarme, og efter 2 Døgns Forløb bleve de godt omrystede, hvorpaa der blev overført Gjennemsnitsprøver i nye Kolber med den selvsamme Sukkeropløsning. Der blev paa den i første Forsøg beskrevne Maade foretaget 5 Kulturer, hvoraf enhver fik Lov til at staa 2 Døgn i Ro. De Kolber, der indeholdt fjerde og femte Kultur, bleve

prøvede, fjerde Kultur efter 8 og femte Kultur efter 10 Døgn, regnet fra Forsøgets Begyndelse. Dette skete i begge Tilfælde derved, at Sukkeropløsningerne med deres Gjærindhold bleve godt omrystede, og Gjennemsnitsprøver derefter overførte i en tilsvarende Række Kolber med Ølurt. De Kolber, hvorfra Prøverne vare tagne, bleve derpaa henstillede en kort Tid i Ro, indtil den Rest af Gjær, der endnu fandtes i dem, havde bundfældet sig, hvorpaa saavidt mulig hele Vædsken blev hældt fra, og i Stedet derfor en passende Portion Urt indført. Paa denne Maade blev der ikke blot arbejdet med Gjennemsnitsprøver, men de to Sæt Kolber med Urt kom nu ogsaa til at indeholde saa at sige al den Gjær, der fandtes i den tilsvarende Kultur i Sukkeropløsningen, og det sidste Sæt af Urtkolberne modtog næsten Intet af den stærkt sure Vædske. Dette sidste har sin Betydning her, hvor det gjælder om at bringe svækkede Gjærceller til at udvikle sig. Der blev bestandig arbejdet med sterile Vædsker og nøje vaaget over, at ingen Organismer udenfra trængte sig ind i Kolberne.

Hvis den beskrevne Behandling i Rørsukkeropløsningen med Vinsyre virkelig fremkaldte en Rensning, saa skulde disse Kolber med Kulturer i Urt nu altsaa indeholde den rensede Bryggerigjær, befriet for alle de oprindelig tilstedeværende Sygdomskim. Efter dette skulde vi altsaa vente henholdsvis i Kulturerne fra A at erholde en ren Vegetation af Bryggeri-Overgjæren, Sacch. cerevisiæ I, i Kulturerne fra B af Carlsberg Undergjær Nr. 1 og Nr. 2, i Kulturerne fra C af Carlsberg Undergjær Nr. 1 og Nr. 2 og i Kulturerne fra D af Sacch. cerevisiæ I. Resultatet blev imidlertid et helt andet.

De omtalte Urtkulturer bleve stillede ind i en Thermostat ved 26° C., men kun de Kolber, som indeholdt Gjæren fra A og B, som havde været underkastet den beskrevne Behandling i Sukkeropløsningen i Løbet af 8 Døgn, viste Tegn til Udvikling, alle de øvrige Vegetationer maatte betragtes som døde; endnu efter et Par Ugers Henstand var der intet Livstegn at opdage. Kolberne med de levende Vegetationer viste tydelige Undergjæringsfænomener, og Øllet havde den ubehagelige bitre Smag og stygge Lugt, som foraarsages af Sygdomsgjærarten Sacch. Pastorianus I. Allerede heraf kunde man slutte, at de ikke kunde indeholde Renkulturer af de oprindelig udsaaede Bryggerigjærarter. Opgaven var nu nærmere at undersøge, hvori deres Gjærindhold bestod, og i den Hensigt blev der foretaget en Spredning og Undersøgelse af Cellerne efter de under første Forsøg beskrevne Fremgangsmaader. Resultatet heraf var, at der kun fandtes een eneste Art, nemlig Syg-

domsarten Sacch. Pastorianus I; kun denne havde overlevet den beskrevne Behandling i Sukkeropløsningen.

### Sjette Forsøg.

Medens der i det foregaaende Forsøg blev udsaaet lige store Portioner af de forskjellige Gjærarter, var i dette Sygdomsgjærarterne kun tilstede i Blandingen med Kulturgjærarterne i Forholdet 1 : 5. Den i hver Kolbe tilstedeværende Bryggerigjær havde altsaa fra Begyndelsen absolut Overvægt. Forsøget blev anstillet med nedenstaaende 5 Kolber.

I A: Sacch. cerevisiæ I, Sacch. Pastorianus I.
- B: En Bryggeri-Undergjærart, Sacch. Pastorianus I.
- C: Carlsberg Undergjær Nr. 2, Sacch. Pastorianus I.
- D: Sacch. cerevisiæ I, Sacch. ellipsoideus II.
- E: En Bryggeri-Undergjærart, Sacch. ellipsoideus II.

Sukkeropløsningen indeholdt i dette Tilfælde kun 3,8 % Vinsyre. Fremgangsmaaden var iøvrigt den selvsamme som i femte Forsøg.

Det viste sig, at Arterne i Kolben D, nemlig Sacch. cerevisiæ I og Sacch. ellipsoideus II, vare døde, efterat de paa den angivne Maade vare blevne dyrkede 10 Døgn i Sukkeropløsningen; efter en saadan Behandling i Løbet af 8 Døgn vare de derimod endnu levende. I alle de øvrige Kolber udholdt idetmindste nogle af Arterne denne Behandling saavel efter 8 som efter 10 Døgns Forløb.

Efterat der var foretaget en Spredning af Cellerne og for hver Kolbes Vedkommende udført et meget stort Antal særskilte Dyrkninger af disse Celler, i nogle Tilfælde indtil 80, efter de foran beskrevne Fremgangsmaader, erholdtes følgende Resultater:

A: Begge de udsaaede Arter vare levende, men medens Cellerne af Sacch. cerevisiæ I ved Forsøgets Begyndelse havde været tilstede i 5 Gange saa stort et Antal som Cellerne af Sacch. Pastorianus I, var Forholdet nu fuldstændig forandret. Sygdomsgjærarten var nu den fremherskende, og Bryggeri-Overgjærarten i den Grad tilbagetrængt, at det kun lykkedes at opdage den derved, at der blev anstillet særlige Kulturer i Ølurt ved 37—38° C., en Varmegrad, der endnu er gunstig for Sacch. cerevisiæ I, medens den er højere end Temperatur-Maximum under de angivne Forhold for Sacch. Pastorianus I.

B: Kun Sacch. Pastorianus I fandtes; af Bryggeri-Undergjæren iagttoges intet Spor.

C: Cellerne af Sacch. Pastorianus I vare tilstede i aldeles overvældende Mængde; af Carlsberg Undergjær Nr. 2 fandtes kun et tvivlsomt Spor.

D: Sacch. ellipsoideus II var tilstede i overvældende Masse; Sacch. cerevisiæ I kunde ogsaa i dette Tilfælde kun iagttages ved at foretage Dyrkning i Urt ved 37—38° C.

E: Begge de udsaaede Arter fandtes, nemlig Bryggeri-Undergjæren og Sacch. ellipsoideus II, men Undersøgelsen viste, at den sidstnævnte nu udgjorde Halvdelen af Gjærblandingen, medens den, som det erindres, ved Forsøgets Begyndelse kun havde udgjort en Femtedel; Sygdomsgjæren havde altsaa ogsaa i dette Tilfælde formeret sig paa Bryggerigjærens Bekostning.

Hovedresultatet af dette Forsøg er, at de to Sygdomsgjærarter, Sacch. Pastorianus I og Sacch. ellipsoideus II, have overvældet Bryggerigjærarterne. Den første af de to nævnte Sygdomsgjærarter giver, som allerede berørt, Øllet en ubehagelig Smag og Lugt, den anden fremkalder i undergjæret Øl den Sygdom, som vi kalde Gjærtykhed. Det har altsaa ikke hjulpet, at Bryggerigjærarterne ved Forsøgets Begyndelse vare tilstede i Overvægt.

Som det erindres, stiller Velten sig i de ovenfor citerede Forelæsninger fuldstændig paa det af Pasteur i Études sur la bière angivne Standpunkt. For ham gjælder det kun at fjerne Bakterierne. Min Lære om Alkoholgjærsvampene tager han intet Hensyn til; naar han har faaet Bryggerigjæren befriet for Bakterier, saa er den efter hans Opfattelse ren. Mine Undersøgelser have imidlertid med Bestemthed vist, at de tre nævnte Saccharomyces-Arter, Sacch. Pastorianus I, Sacch. Pastorianus III og Sacch. ellipsoideus II fremkalde Sygdomme i undergjæret Øl (se Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet, II Bd. 2 H., 1883, p. 93, og Zeitschrift für das ges. Brauwesen, München 1884, p. 273), og Rigtigheden heraf er bleven bekræftet af A. Jørgensen, Grønlund, Will og andre. Will har tilmed i de senere Aar paavist, at der foruden de nævnte findes flere andre Saccharomyceter, som kunne fremkalde Sygdomme i Øl. Alt viser endog hen til, at der findes et stort Antal af saadanne Arter. Spørgsmaalet om, hvorvidt der ved den beskrevne Dyrkning af Bryggerigjæren i Sukkeropløsningen opnaas en Rensning eller ej, maa altsaa i Følge ovenstaaende ikke blot stilles med Hensyn til Bakterierne, men tillige ganske særlig med Hensyn til de omtalte Sygdoms-Gjærarter. Set fra dette Synspunkt gaa ikke blot femte og sjette Forsøg mod Veltens Paastand; men det Samme gjælder i Virkeligheden ogsaa om de 4 første Forsøg.

Den af Velten anbefalede Pasteurske Fremgangsmaade til at rense Bryggerigjæren fremkalder altsaa, naar Talen er om Sygdomsgjærarter, slet ingen Rensning, men bevirker tvertimod, at Sygdomsgjærarterne udbrede sig stærkere. Dette gjælder saavel i Forsøgene med Over- som med Undergjær. Denne Fremgangsmaade er følgelig aldeles ubrugelig i Bryggerierne. Hvor den indføres, vil den foraarsage store Pengetab og store Vanskeligheder. Efter dette vil det være ørkesløst nærmere at undersøge, hvad Velten forøvrigt beretter om denne Fremgangsmaade.

Sjette Forsøg viste ligeledes, at Methoden ej heller i den der anvendte Form giver nogen Sikkerhed for at opnaa en Renkultur.

I biologisk Henseende have de foran omtalte sex Forsøg lært os, at de tre Bryggeri-Undergjærarter, hvormed der blev experimenteret, ikke formaa at udholde Behandlingen i Sukkeropløsningen med Vinsyre; lidt større Modstandskraft syntes Overgjærarten Sacch. cerevisiæ I at være i Besiddelse af; men ogsaa denne blev overvældet af de vilde Gjærarter; størst Modstandskraft viste Sacch. Pastorianus I og Sacch. ellipsoideus II. Under andre Forsøgsbetingelser ville Resultaterne maaske kunne stille sig lidt anderledes.

I en anden Henseende have disse Undersøgelser Betydning for os; de vise nemlig hen til, at vi i den beskrevne Fremgangsmaade vistnok ville kunne faa et værdifuldt Hjælpemiddel ved den praktiske Analyse af Bryggerigjæren. Naar Spørgsmaalet er, om der i en forelagt Prøve findes Sygdomsgjærarter eller ej, anvendes den af mig for nogle Aar siden givne Methode, idet der anstilles Sporekulturer ved 25° og 15° C. Sygdomsgjærarterne danne nemlig under disse Omstændigheder deres Sporer tidligere end Bryggerigjærarterne, endvidere er der ogsaa Forskjel paa Sporernes Udseende. Holm og Poulsen have fundet, at man ved Hjælp af denne Methode er i Stand til at paavise en saa ringe Indblanding af Sygdomsgjær i Bryggerigjæren som $^1/_2$ %. (Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet, II Bd., 4de og 5te Hefte, p. 147 og 211). Det er dog forbundet med Vanskelighed og kræver en temmelig stor Øvelse at opdage saa ringe Indblandinger. Af det Foregaaende have vi imidlertid set, at en Dyrkning i en af de beskrevne Sukkeropløsninger vil være et godt Hjælpemiddel til at bringe idetmindste nogle af de Sygdomsgjærarter, som kunne findes i Bryggerigjæren, til at udvikle sig kraftigere og altsaa til paa en mere øjensynlig Maade end tidligere at give sig tilkjende. Denne Opgave fortjener at blive nøjere gjennemarbejdet og ikke blot med

de tre Sygdomsgjærarter, som jeg i 1883 beskrev, men tillige med dem, der i den nyeste Tid ere blevne opdagede, navnlig af H. Will. Ved at anvende højere Temperatur end almindelig Stuevarme vil man rimeligvis hurtigere komme til et Resultat. En praktisk Interesse vil det ligeledes have at erfare, hvorledes Arterne stille sig i ovennævnte Henseende, naar man i Stedet for Sukkeropløsning anvender Ølurt med Vinsyre.

Jeg ønskede helst nu ligesom tidligere at undgaa Alt, hvad der kan kaldes Kritik af Pasteurs Arbejder, men mine Modstandere have ikke tilladt det. Undersøge vi nøjere, hvad Pasteur egentlig har ment, naar han taler om at fremstille en ren Gjær til Bryggeribrug, saa finde vi vel ikke i hans Værk saa tydelig Besked derom, som vi kunde ønske, men Alt tyder dog nærmest paa, at han ogsaa i den Henseende allerede for over 14 Aar siden selv har erkjendt Grændserne for sine Methoder (Études sur la bière, p. 227), og at hans Maal kun har været at befri Bryggerigjæren for Bakterier. Naar han i det nævnte Værk, p. 4—7, giver en Oversigt over de Sygdomsformer, der efter hans Undersøgelser kunne angribe Øllet, er der derfor ogsaa kun Tale om Bakterier og slet ikke om Alkoholgjærsvampe. (Den samme Opfattelse har, som vi ovenfor have hørt, ogsaa Velten, og den blev ligeledes udtalt af Duclaux i hans to Værker, Chimie biologique, 1883, p. 618, og Le microbe et la maladie, 1886, p. 91—95). Efterat Pasteur har omtalt de forskjellige Fremgangsmaader, som han i 1876 anvendte til Gjærens Rensning, siger han p. 227: »Det bedste Middel til at afgjøre, om en Gjær er ren eller ej, bestaar deri, at man benytter den til at fremstille noget Øl i en tohalset Kolbe, og naar Gjæringen er standset, stiller man da denne Kolbe ind i en Thermostat ved 20—25° C. Hvis Øllet efter nogle Ugers Forløb under disse Omstændigheder ikke bliver uklart eller bedækkes med Hinde; hvis Gjærbundfaldet ved en mikroskopisk Undersøgelse ser ud til at være rent, og hvis Øllets Smag endelig ikke paa anden Maade har taget Skade, end at den er bleven flau, saa har man al Grund til at stole paa, at Gjæren har været ren.«

Forsaavidt der ved denne Prøve kun tænkes paa at faa Oplysning, om der er Bakterier og hindedannende Mycoderma-Arter tilstede eller ej, er den upaaklagelig. Aldeles ubrugelig er den derimod, naar Spørgsmaalet tillige er, om de tilstedeværende Gjærceller tilhøre een eller flere Arter. Ja, Bundgjæren kan godt bestaa af en Blanding af en god Ølgjær sammen med nogle af de

værste Sygdoms-Gjærarter, uden at man under de beskrevne Omstændigheder vil være i Stand til at opdage dem! Den mikroskopiske Undersøgelse er i dette Tilfælde aldeles utilstrækkelig, og det Samme gjælder om de andre Kjendetegn, som angives. Allerede en theoretisk Betragtning viser dette, og haandgribelige Beviser herfor erholder man, naar man anstiller direkte Forsøg.

Der vil altsaa kun være god Mening i Pasteurs Prøve, hvis vi forstaa den saaledes, at den udelukkende skal gjælde Bakterier og Mycoderma-Arter[1]).

Tydeligst udtaler Pasteur sig om dette Spørgsmaal i Bulletin de la société d'encouragement pour l'industrie nationale, Janvier 1887, p. 45, hvor han siger: »Hansen er den første, der har indset, at Bryggerigjæren maa være ren, ikke blot i Henseende til Bakterier, de egentlige Sygdomsfermenter, men at den ogsaa bør være befriet for de vilde Gjærarter.«

Betydningen af Pasteurs Fremgangsmaade er altsaa den, at man derved kan befri Gjæren for Bakterier. Men en Fejl er det at anvende Behandlingen med Saccharose og Vinsyre paa den voldsomme Maade, som Velten tilraader. Hvis man overhovedet vil bruge denne eller en lignende Fremgangsmaade, maa man gaa

---

1) Allerede flere af Pasteurs Forgængere have udtalt den Anskuelse, at Alkoholgjærsvampene under forskjellige Omstændigheder kunne foraarsage Forstyrrelser i Driften, men de gave ligesaa lidet som Pasteur Undersøgelser, hvorved der kunde bringes Klarhed over dette Spørgsmaal; det blev endnu i 1876 betragtet som et mindre væsentligt. En ikke ringe Literatur fandtes vel allerede da derom, men kun mangelfulde Forsøg, uklare Diskusioner og modstridende Meninger. Hvor liden Vægt Pasteur lagde derpaa ses blandt andet deraf, at han paa intet Sted citerer sine Forgængeres Bidrag. Med de Methoder, der stode til hans Raadighed, var en Løsning forøvrigt ogsaa umulig. Hans ovenfor omtalte Standpunkt er følgelig, videnskabelig set, aldeles rigtigt; han drager her selv Grændserne for, hvad der er kjendt og hvad ikke.

Nogle zymotekniske Tidsskrifter have i den nyere Tid henvist Bryggerne til Pasteurs ovenfor beskrevne Gjæringsprøve i den tohalsede Kolbe som et Middel til at erfare, hvorledes Øllet i Driften vil stille sig. Dette er imidlertid et stort Misgreb! Det Øl, der fremkommer i Kolben, er af en hel anden Art end det, der findes i Bryggeriet, selv om Gjæren og Urten er den samme. Gjæringen er i de to Tilfælde foregaaet under saa forskjellige Forhold, at en Sammenligning slet ikke kan finde Sted. Det har ej heller nogensinde været Pasteurs Mening, at den af ham angivne Prøve skulde anvendes paa den Maade.

frem med stor Forsigtighed og kun anvende smaa Syremængder og i det Hele taget en mindre skarp Behandling; man maa, som Pasteur siger i det citerede Værk, prøve sig frem. De forangaaende Forsøg give en vigtig Belæring i den Henseende; de vise, at man med Sikkerhed kun kan anvende denne Fremgangsmaade i saadanne Tilfælde, i hvilke den Bryggerigjær, der skal renses for Bakterier, ikke indeholder andre Gjærarter end den ønskede. Den rationelle Fremgangsmaade er dog ogsaa i disse Tilfælde at indføre en virkelig Renkultur. En Fejl fra Veltens Side er det, at han har søgt at modarbejde dette.

Pasteurs og mine Arbejder betegne to forskjellige Standpunkter.

For Pasteur er det Bakterierne, som fremkalde Øllets Sygdomme, og hans Opgave bliver derfor den at befri Gjæren for disse smaa Væsener; dette opnaar han f. Ex. ved den foran beskrevne Fremgangsmaade. Hans Maal er at rense Bryggerigjæren (purification des levûres) og ikke at fremstille en virkelig Renkultur deraf.

For mig spille derimod Alkoholgjærsvampene Hovedrollen. Da jeg i 1883 havde vist, at nogle af de almindeligste og farligste Sygdomme i undergjæret Øl ikke skyldes Bakterier, men visse Saccharomycesarter, saa fulgte allerede heraf, at en Rensning af Gjæren som den foran beskrevne ikke kunde føre til Maalet, men at der maatte kræves en virkelig Renkultur. Og da jeg ved at underkaste Saccharomyceterne et indgaaende Studium saa, at mine Forgængeres Anskuelser om Species paa dette Omraade vare urigtige, idet der f. Ex. under det systematiske Navn Sacch. cerevisiæ skjuler sig en hel Række, i deres Virkning meget forskjellige Over- og Undergjærarter og Racer, saa fulgte atter heraf, at det ikke var nok at fremstille en Renkultur, men at man, for at fyldestgjøre de Krav, der efter Produktets forskjellige Beskaffenhed stilles ved Fabrikationen af de forskjellige Ølsorter, af Spiritus, Pressegjær og Vin, maa foretage et planmæssigt Udvalg af den mest passende Art eller Race. Saaledes kom jeg i Gjæringsindustrien til at indføre de samme Principer, som i lange Tider i Have- og Landbruget have været anvendte ved Dyrkningen af de højere Planter.

Idet jeg altsaa gik ud fra andre Synspunkter og andre Methoder end min berømte Forgænger, maatte ogsaa Resultaterne blive anderledes. Ofte har jeg i mine Skrifter fremhævet den store Betydning, som Études sur la bière har haft for mine Arbejder, og jeg gjentager dette atter her med Erkjendtlighed.

Derimod maa jeg protestere imod de Forsøg, der ere gjorte fra fransk Side paa at standse Udviklingen og at føre Alt tilbage til Standpunktet i 1876; thi dette strider mod Fremskridtets Aand. Hvis mine Modstanderes berømte Lærer havde fortsat sine Studier paa dette Omraade, vilde han selv have bragt dem meget videre.

December 1890.

# Undersøgelser over Alkoholgjærsvampenes Fysiologi og Morfologi.

Af

**Emil Chr. Hansen.**

# VIII.

## Om Sporernes Spiring hos Saccharomyceterne.

(Første Afhandling.)

### I. Indledning.

Den første Meddelelse om Endosporer hos Gjærceller finde vi vistnok i Schwanns »Mikroskopische Untersuchungen« (Berlin 1839, p. 234—236). Idet han paa dette Sted fremfører nye Beviser for den epokegjørende Theori, som Cagniard de Latour og han kort Tid forinden havde opstillet, nemlig, at det er levende Celler, som fremkalde Alkoholgjæringen, udtaler han sig ogsaa nærmere om disse Cellers Natur. Han meddeler, at de henhøre til Svampene, at de skyde nye Celler ud fra Enderne og formere sig som Svampene, dels derved, at de enkelte Celler frigjøres, og dels derved, at der i Cellernes Indre dannes nye Celler, som blive frie, idet Modercellerne briste.

Den første tydelige Beskrivelse af Sporer hos Gjærceller skylde vi dog J. de Seynes (1868). Kort Tid derefter bleve de af Reess paaviste hos flere Arter, og nogle Oplysninger meddelte om deres Spiring[1]). Om denne mener han, at den foregaar paa samme Maade hos alle Arter: Sporerne svulme, og de udfylde herved aldeles Modercellen, saa at dennes Væg enten opløses eller kommer til at slutte sig tæt om Døtrecellerne; den egentlige Spiring bestaar deri, at de udskyde knopformede Udposninger, som derpaa

[1]) Reess, Botan. Untersuchungen über die Alkoholgährungspilze, 1870, p. 12, 26, 75.

voxe ud til lignende Gjærceller, som dem, i hvis Indre Sporerne oprindelig bleve dannede.

Engel (1872), Brefeld (1876) og De Bary (1884) kom senere til lignende Resultater og føjede intet Nyt til.

Mine første Undersøgelser over disse Formeringsorganer havde hovedsagelig den Opgave at udfinde Lovene for deres Udvikling og at udarbejde en Methode, hvorved man med Sikkerhed kunde bringe Saccharomyces-Cellerne til at udvikle dem[1]). Det er hertil nemlig langtfra tilstrækkelig at foretage en Udsæd paa en eller anden fugtig Flade (Gulerodskiver, Gibsblokke, Gelatine o. s. v.). I 1885 gav jeg i Botan. Centralblatt en kortfattet Meddelelse om de saakaldte Skillevægdannelser, der kunne fremkomme paa Spiringens første Stadier, og om Sammenvoxning mellem sammenstødende Sporers Vægge. En udførligere Fremstilling af disse Forhold findes i det Følgende. Senere har jeg offentliggjort flere Studier over Variations-Fænomenerne og navnlig paavist, hvorledes man er i Stand til at foretage en dybt indgribende Omdannelse af Saccharomyces-Cellen, saa at den fuldstændig mister Evnen til at udvikle Sporer, altsaa opgiver sin væsentligste Karakter[2]).

Medens mine foran nævnte Undersøgelser for største Delen ere af fysiologisk og biologisk Natur, har jeg i de her foreliggende behandlet udviklingshistoriske og morfologiske Spørgsmaal. Jeg har med Forsæt begrændset mit Arbejde til mikroskopiske Studier af Spiringsfænomenerne og har ikke foretaget nogen særlig Undersøgelse over de derved virksomme Faktorer. Hvad mine Forgængere meddele om Sporernes Spiring skyldes Iagttagelser af forskjellige Exemplarer, og disse Iagttagelser have de derpaa kombineret til et samlet Billede; de have ikke direkte forfulgt alle Spiringsstadierne hos en og samme Spore. Det er imidlertid først derigjennem, at man opnaar et nøje Kjendskab til alle Fænomenets Sider, og visse Forhold kan man overhovedet kun paa den Maade opdage. Jeg har derfor netop lagt Hovedvægten paa denne Fremgangsmaade. Forøvrigt var min Arbejdsplan den, først at studere en af de almindelige Arter, som idetmindste stod dem nær, der havde været

---

[1]) Emil Chr. Hansen, Om Askosporedannelsen hos Slægten Saccharomyces. (Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet, II B. 2 H., 1883, p. 29).

[2]) Emil Chr. Hansen, Ueber die in dem Schleimflusse lebender Bäume beobachteten Mikroorganismen. (Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, V Bd., 1889, p. 664 o. flg.). Production de variétés chez les Saccharomyces. (Annales de Micrographie, Tome II, Paris 1890, Nr. 5).

Gjenstand for mine Forgængeres Undersøgelser, og dernæst fra dette Udgangspunkt at foretage sammenlignende Studier over andre Arter for at se, om Spiringen virkelig, som man hidtil antog, foregik paa den samme Maade hos alle. Undersøgelserne bleve hovedsagelig anstillede med de tre Arter, Sacch. cerevisiæ I, Sacch. Ludwigii og Sacch. anomalus. En Oversigt over Resultaterne findes i Afhandlingens sidste Kapitel.

## 2. Saccharomyces cerevisiæ I.

(Denne Art har jeg behandlet i mine »Undersøgelser over Alkoholgjærsvampenes Fysiologi og Morfologi«, disse Meddelelsers II Bd. 2 Hefte, 1883, 4 Hefte, 1886, og 5 Hefte, 1888. En Sammenstilling af disse Undersøgelser i overskuelig Form findes i Jørgensens Bog »Die Mikroorganismen der Gährungsindustrie«, 2te Ausgabe, Berlin 1890, og i Zopfs Haandbog »Die Pilze«, Breslau 1890).

Anstiller man paa den Maade, som jeg har beskrevet det i min foran citerede Afhandling fra 1883, Kulturer paa fugtig Gelatine eller paa en fugtig Gibsblok ved 25° C., saa ville et større eller mindre Antal af Cellerne efter et Døgns Forløb indeholde tydelige Anlæg til Sporer (Fig. 1 *a, b, c, d*).

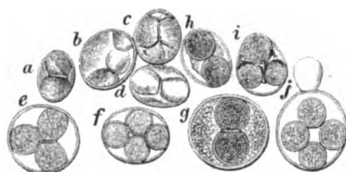



**Fig. 1.**

**De første Udviklingstrin af Sporerne hos *Sacch. cerevisiæ I.* Forstørrelsen 1000 Gange linear.**

Disse have endnu ikke erholdt en tydelig Væg; men denne er i det Højeste tilstede som en svag Antydning; de staa i Forbindelse med hverandre og have allerede paa dette tidlige Udviklingstrin under deres Væxt udøvet et Tryk paa hinanden (*a, c, d, e*). De nævnte Afbildninger ligesom ogsaa *h, i, g* vise, at en Del af Modercellens Plasma er bleven tilbage. De allerførste Udviklingstrin ere endnu ikke nøjagtig undersøgte og forbigaas derfor paa dette Sted; for den foreliggende Opgave have de ej heller nogen Betydning.

Efter at de beskrevne Kulturer ere blevne et Døgn ældre, findes der et meget stort Antal Celler med Sporer som *f, g, h, i, j*. De

have antaget rund Form, og deres Væg ses mere eller mindre tydeligt; de ere nu fuldt udviklede.

Under de foreliggende Omstændigheder begynder Spiringen strax efter Modningen; alle Udviklingstrinene gaa jævnt over i hverandre, skarpe Grændser findes ikke[1]. Sporen optager Vand og deri opløste Næringsstoffer, den tager herved til i Størrelse, og Resterne af Modercellens Plasma forsvinde eller blive delvis tilbage som en Masse, der presses sammen mellem de svulmede Sporer (Fig. 1 *h, i*); ofte findes den knyttet til disse som smaa Korn og Tverbaand (Fig. 2 *e, f*). Den slimede Masse, som omgiver Sporerne, skyldes vel, idetmindste for en Del, Modercellens Indhold, men det er rimeligt, at Sporerne selv ogsaa frembringe en Slimindhylning, der navnlig vil kunne tjene som et skjærmende Dække, naar de tørre ind. Hos de vegetative Celler har jeg ved en mikroskopisk Undersøgelse kunnet paavise, at der under visse Livsforhold findes en stærkt udviklet Slimdannelse, og at denne ved en passende Præparation træder frem som et gelatinøst Netværk, i hvis Masker selve Gjærcellerne ere indlejrede. (Meddelelser fra Carlsberg Laborat., II Bd. 4 H., 1886, p. 198). For Sporernes Vedkommende er det forbundet med Vanskeligheder at afgjøre, hvad der i den Henseende hidrører fra Modercellens tilbageblevne Indhold, og hvad der virkelig hører Sporevæggene selv til. Under den Væxt, som saaledes paa Spiringens første Stadier indtræder, forøges Sporens Rumfang ofte i meget høj Grad (sammenlign f. Ex. Fig. 1 med Fig. 2). Hos nærværende Art indtræder da meget hyppig det Tilfælde, at Sporerne komme til fuldstændig at udfylde hele Modercellen, og at dennes Væg derved saa nøje bliver udspændt om disse, at man ved en almindelig mikroskopisk Undersøgelse slet ikke er i Stand til at opdage den. Under denne stærke Væxt og Opsvulmen trykke Sporerne hverandre, saa at de miste deres runde Form, og der fremkommer Figurer, som se ud som Skillevægge (Fig. 2 *a, d*, Fig. 3 *c, d, e, f, g*).

Ved at behandle Præparatet med Kemikalier og Farvningsmidler eller ved at foretage en Sprængning, opdager man den rette Sammenhæng. I Fig. 2 *e* har jeg afbildet en Gruppe af fire sammenhørende Sporer, som før Sprængningen af Modercellens Væg

---

[1]) Det er derfor vanskelig at angive Sporens sande Størrelse. Ved Udmaalingen vil det vistnok være rigtigst at vælge det Stadium, da Væggen netop er dannet. Den Væxt, som derefter finder Sted, maa nærmest henregnes til Spiringen, selv om der ikke optages andet end Vand.

havde væsentlig samme Udseende som Fig. 2 *d*; efter Sprængningen har Væggen trukket sig sammen om den øverste Spore.




Fig. 2.

Sporer i begyndende Spiring hos *Sacch. cerevisiæ I.* Forstørrelsen 1000 Gange lineær. Den saakaldte Skillevægdannelse ses tydelig i *a*, *d*, *e* og *g*. I *e*, *f* og *g* ere Modercellevæggene sprængte, *g* viser en virkelig Skillevægdannelse, idet tre Sporer ere smeltede sammen til et flerrummet Sporelegeme; dettes sammenhængende Væg er sprængt paa tre Steder.

Da den sprængte Væg nu indtager et meget mindre Rumfang end tidligere, maa den følgelig være elastisk og have været stramt udspændt omkring Sporerne. I *f* ses en lignende sprængt Hinde; de to her afbildede Sporer have hver dannet en lille Knop.

De to sidstnævnte Afbildninger vise os tillige, at Skillevægdannelsen her er fremkommen derved, at stærkt lysbrydende Plasma er blevet presset sammen mellem Sporerne. Idet den øverste Spore i Fig. 2 *e* har løsnet sig fra de øvrige, ser man dette tydeligt. En Del af dette Plasme findes endnu paa Sporen tilvenstre, og herfra fortsætter det sig ned mellem denne og de to andre Sporer, som have bevaret Forbindelsen. Fig. 2 *f* viser ligeledes dette Forhold; i Skillevæggens Midte findes nemlig kileformet sammenpresset, glindsende Plasma, der til begge Sider rager lidt udenfor Sporerne, og altsaa herved viser sig at være en Masse, der ikke hører til Sporevæggen. I Fig. 2 *b* og *c* iagttages derimod intet Spor af en saadan Plasmamasse. Hvad vi her have kaldt Skillevægdannelse fremkommer altsaa enten derved, at en større eller mindre Mængde Plasma presses sammen som Kiler eller Plader mellem de opsvulmede Sporer, eller kun derved, at Sporernes egne Vægge træde i en inderlig Berøring med hverandre[1]).

---

[1]) Det synes ogsaa, som ovenfor berørt, at Sporerne, efter at de ere blevne modne, under deres Væxt og Spiring selv kunne udsondre en Slimindhylning, der da ligeledes kan blive presset sammen mellem Væggene. En afgjørende Undersøgelse har jeg dog, som sagt, ikke paa dette Punkt.

Der gives imidlertid ogsaa Tilfælde, i hvilke Sporerne i den Grad ere fast forbundne, at de ikke kunne skilles ad, selv om man udøver et meget stærkt Tryk paa Dækglasset eller presser dette frem og tilbage. Ved en saadan voldsom Behandling sprænges tilsidst ikke blot Modercellens, men ogsaa Sporernes Væg. I Fig. 2 *g* ses et saadant Tilfælde. Da Undersøgelsen begyndte, fandtes en Modercelle som Fig. 2 *a*, hvis Væg stramt omsluttede tre Sporer med stærkt fremtrædende Skillevægdannelse. Fig. 2 *g* viser os Præparatet, efterat Sprængningen er indtraadt; forneden findes Modercellevæggen, foroven de indbyrdes forbundne Sporer, hvis Vægge ere bristede paa tre Steder. I denne Skillevægdannelse var det ikke muligt at opdage nogen adskillende Fure, der kunde vise hen til, at Sammensmeltningen mellem de sammenstødende Vægge var ufuldstændig. Man har, kort sagt, her igjen en ny Modifikation, nemlig et flerrummet Sporelegeme, hvis Vægge danne en Enhed, og altsaa en virkelig Skillevægdannelse.

Vi have ovenfor set, at Sporerne strax, efter at de ere dannede, kunne begynde at spire. Saalænge de befinde sig paa den fugtige Overflade af Gelatinen eller paa den fugtige Gibsblok, hvor de bleve udviklede, komme de som Regel dog ikke ud over Spiringens første Stadier, en Opsvulmen er her almindelig, men en Knopskydning indtræder kun sjelden. I de Tilfælde, hvor jeg iagttog en saadan, var det kun hos Celler, som havde tilbragt lang Tid paa Gelatinen eller Gibsblokken. Med større Lethed finder Knopskydningen Sted, naar Sporerne ere neddykkede i ikke for tykke Vandlag; for at den skal indtræde med Kraft, kræves dog en gunstig Næringsbund, rigelig Adgang til Luftens Ilt og en temmelig høj Temperatur. I mine Forsøg viste det sig, at disse Betingelser fyldestgjøres ved at foretage Dyrkningen i stærkt luftet, humlet Ølurt (8—12 % Ball.) ved 25° C. En næppe saa kraftig Udvikling erholdes, naar man til den nævnte Næringsvædske sætter 4—5 % Gelatine.

Nogen Indflydelse paa Udviklingen har endvidere den Tilstand, hvori vedkommende Spore befinder sig, om den nemlig er ung eller gammel, og om den før Udsæden har været indtørret eller ikke. Gamle Sporer kunne i Reglen ikke udvikle Knopper, naar de befinde sig i Vand ved almindelig Stuevarme, men kræve, for at det skal kunne ske, en højere Varmegrad, f. Ex. 25° C., derimod udvikle de selvsamme Sporer i Ølurt en kraftig Vegetation selv ved en lavere Temperatur. I Vand og mindre gode Næringssubstrater kan Knopskydningen vel indtræde ligesaa hurtig som i Ølurten, men det er kun et ringere Antal Sporer, som under disse Omstæn-

digheder naa denne Udvikling, og den standser hurtig. I Forklaringen til Fig. 3 findes Tidsangivelser og nogle andre Enkeltheder vedrørende Spiringen.

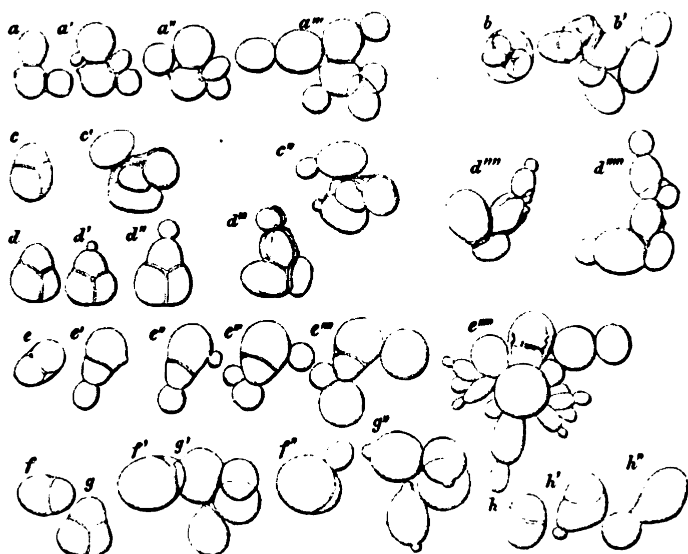


Fig. 3.

Sporernes Knopskydning hos *Sacch. cerevisiæ I.* Forstørrelsen 1000 Gange lineær. Rækken *e*—*e'''''* stammer fra Dyrkning i Urtgelatine i Bøttchers Kammer; de øvrige Rækker derimod fra Dyrkning i den fortyndede Urt i Ranviers Kammer. Temperaturen var i alle Tilfælde omkring 20° C.; *a* og *b* vare Sporer, som i Løbet af 3 Uger vare blevne udsatte for en temmelig stærk Indtørring; i alle de øvrige Forsøgsrækker blev der anvendt unge, friske Sporer; Tidsangivelserne ere bestandig regnede fra Forsøgets Begyndelse. *a* tre indbyrdes forbundne Sporer, men uden Modercellevæggen; *a'* efter 19, *a''* efter 22 og *a'''* efter 30 Timers Forløb. *b* en Celle med 4 Sporer, hvoraf de to, der ere tegnede med svagere Omrids end de andre, ligge bagved disse; *b'* samme 18 Timer senere, Modercellens Væg er sprængt og en Knopskydning begyndt. *c* en Celle med 4 Sporer, hvoraf kun de 3 ses, *c'* samme 9 Timer senere, den sprængte Modercellevæg indhyller tildels de tre af Sporerne; *c''* efter $10^1/_2$ Times Forløb. *d* en Celle med 3 Sporer, *d'* efter $10^1/_2$, *d''* efter 13, *d'''* efter 17 Timers Forløb; i sidstnævnte Afbildning ses den sprængte Modercellevæg tilhøjre; *d''''* efter 21, *d'''''* efter 25 Timers Forløb. *e* en Celle med 2 Sporer; de følgende Afbildninger *e'*—*e'''''* vise Udviklingstrinene efter henholdsvis $7^1/_2$, $8^1/_2$, 11, 20 og 50 Timers Forløb; i *e'''''* har der dannet sig en stærkt udviklet Koloni, og Tværvæggen mellem de to Sporer er næsten overalt opløst. *f.* og *g* to Celler med Sporer; *f' g'* efter 22, *f'' g''* efter 25 Timers Dyrkning. *h* en Celle med 2 Sporer; *h'* efter 9, *h''* efter 13 Timers Dyrkning; i *h''* er Væggen mellem de to Sporer forsvunden og begge blevne til een.

I ovenstaaende Fig. 3 har jeg afbildet 8 Forsøgsrækker, der vise, hvorledes Knopskydningen foregaar hos den nævnte Art. Jeg har paa Mikroskopbordet fulgt hele Udviklingen Skridt for Skridt. Sporerne bleve udsaaede i fugtige Kamre dels i Urt dels i Urtgelatine, og jeg anstillede mine Forsøg saavel med gamle Sporer, der i længere Tid havde været indtørrede, som med unge, nydannede; i morfologisk Henseende viste der sig ingen Forskjel. Spiringen begynder dermed, at Sporerne tiltage stærkt i Størrelse, Modercellens Væg udspændes herved i høj Grad og sprænges tilsidst (*b'*, *c'*), undertiden sker dette dog først, efter at en af Sporerne har udviklet en Knop (*d'*, *d''* og *d'''*). Den sprængte Væg ses som en foldet og rynket, meget tynd Hinde, der lig et Slør delvis indhyller de Sporer, som den kort forinden fuldstændig indesluttede. Den er tydelig forskjellig fra den faste, spændige og temmelig tykke Hinde, som findes, førend Spiringen ret har begyndt, og som man kan iagttage, naar man paa dette tidligere Udviklingstrin fremkalder en Sprængning f. Ex. ved at udøve et passende Tryk paa det Dækglas, der dækker vedkommende Præparat (se Fig. 2 *e*, *f*, *g*). Under Spiringen udspændes altsaa Modercellens Væg i en meget høj Grad, og samtidig hermed bliver den tyndere og finere og opløses tilsidst. Ofte er man slet ikke i Stand til at opdage, hvad der sker med den. Det er vel ej heller umulig, at den i saadanne Tilfælde fuldstændig opløses i Slim, og at den i denne Tilstand kan tjene til Ernæring for Sporerne under Knopskydningen, eller, hvis Spiringen afbrydes, som en skjærmende Indhylning. Sporerne tage, som Figurerne vise, fremdeles til i Størrelse, undertiden i en paafaldende Grad (sammenlign f. Ex. *a* med *a'''* og *e* med *e''''*), og samtidig hermed skrider Knopskydningen frem; først naar denne har varet en Tid, standse de deres Væxt. De kunne i Løbet af 30—50 Timer give Anledning til Dannelsen af store Cellekolonier (*a'''*, *e'''''*). En Spore kan ligesom den vegetative Celle udvikle en eller flere Knopper, og disse kunne dannes fra ethvert Punkt af dens Overflade.

Vi have ovenfor hørt, at Sporerne, medens de endnu ere indesluttede i Modercellen, ofte ere indbyrdes meget fast forbundne, ja undertiden fuldstændig sammenvoxede (Fig. 2 *g*). Efter at den dem omgivende Membran under Spiringen er bristet, kunne de vedblive at være i Forbindelse med hverandre (Fig. 3 *a*—*a'''*; *d*—*d'''''*; *e*—*e'''''*), eller ogsaa skilles ad (Fig. 3 *b*—*b'*; *c*—*c''*; *g*—*g''*); det sidste Tilfælde er vistnok ligesaa hyppig som det første. I Sporesamlinger, der bestode af 3 eller 4 Sporer, kom den ene

Spore ikke til at spire; da jeg bestandig iagttog dette, synes det altsaa at være Reglen.

Et særlig ejendommeligt Forhold vise Rækkerne $e$—$e'''''$ og og $h$—$h''$. Betragte vi den første af disse, saa se vi, at endnu i $e''''$ er Skillevæggen mellem de to Sporer bevaret, men i $e'''''$ er den næsten opløst i hele sin Udstrækning, de to Sporer ere herved blevne til een. Den øverste Spore dannede kun een Knop, den nederste derimod et større Antal; det er derfor ikke usandsynligt, at en Del af hins Indhold er kommet denne tilgode. Paa samme Maade se vi, at de to Sporer $h$ under Væxten og Knopskydningen ere blevne til een, $h''$. Idet en saadan Sammensmeltning kan finde Sted, synes Sporerne derved at have større Udsigt til under vanskelige Forhold at komme til at udvikle Knopper, end naar de ere adskilte; heri ligger maaske den biologiske Betydning af dette Forhold. Den ene Spore synes i de beskrevne Tilfælde at optræde som Parasit overfor den anden. Det er første Gang, at en saadan Iagttagelse er gjort hos Saccharomyceterne. En Begyndelse til denne Sammensmeltning have vi maaske i det foran omtalte flerrummede Sporelegeme.

Beskrivelsen af ovenstaaende Udviklingsrækker grunder sig, som det blev bemærket, paa Dyrkning i fugtige Kamre, udført paa Mikroskopbordet og under stadig mikroskopisk Kontrol. Denne Fremgangsmaade bør altid anvendes, naar det gjælder om at forfølge en Mikroorganismes Udvikling. Det er imidlertid kun et begrændset Antal Former, som man paa den Maade faar til Undersøgelse. For Overblikkets Skyld er det derfor heldigst tillige at anstille Massekulturer. Ved disse har man ogsaa mere frie Hænder

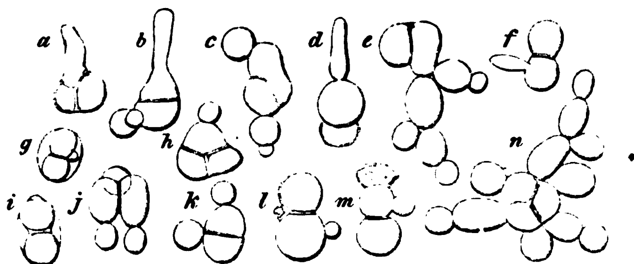



Fig. 4.

Gamle Sporers Spiring hos *Sacch. cerevisiæ I.* Forstørrelsen 1000 Gange lineær.

til at variere Forsøgsanordningen. Hosstaaende Fig. 4 viser os de forskjellige Former, som jeg har iagttaget ved at udsaa Sporer fra

gamle fugtige eller indtørrede Kulturer, dels i Vand, dels i Urt. Dyrkningen blev i nogle Tilfælde foretaget ved 25° C., i andre ved almindelig Stuevarme. Nogen Regel for Fremkomsten af de abnorme Former fandtes ikke, og ved at anvende andre Næringssubstrater end de nævnte, iagttoges intet Nyt. Det har derfor ingen Interesse nærmere at beskrive Forsøgene.

I disse Tilfælde var det ligeledes Regel, at Knoppen kom frem som en lille Vorte paa et begrændset Punkt af den opsvulmede Spore, men denne udviklede ikke blot ovale og runde Knopper *(c, e, j, h)*, men tillige pølsedannede *(d, f)*; sidstnævnte dog i forholdsvis ringe Antal. En Spiring som *a* og *b* var sjelden, og ogsaa denne endte tilsidst i en almindelig Knopskydning. Ikke sjelden iagttoges Sporer *(c, e, j)*, som under Spiringen havde strakt sig; saadanne ere forøvrigt ogsaa afbildede i Fig. 3. Et smukt Exempel paa en Sporegruppe, hvis Sporer vedbleve at staa i fast Forbindelse med hverandre, ogsaa efter at en rig Knopskydning havde fundet Sted, ses i *n*. I *g* og *i* haves Exempler paa, at en Knopskydning kan begynde inde i Modercellen; i *i* ere Sporerne opsvulmede, og Alt viser hen til, at Knopskydningen paa normal Maade vil blive fortsat; denne Celle stammer ogsaa fra en Kultur i Urt, *g* derimod fra en Kultur i Vand. Sidstnævnte er et abnormt Forhold, der af og til optræder under mangelfulde Ernæringsvilkaar, og som jeg ligeledes har fundet hos andre Arter.

Paa samme Maade som hos Sacch. cerevisiæ I foregaar Spiringen ogsaa i alt Væsentligt hos de Arter af Grupperne Sacch. Pastorianus og Sacch. ellipsoideus, som jeg hidtil har undersøgt i den Henseende.

## 3. Saccharomyces Ludwigii.

Jeg har opkaldt denne Art efter Prof. Dr. F. Ludwig, som først opdagede den. I Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, V Bd., 1889, gav jeg S. 638 en udførlig morfologisk og fysiologisk Beskrivelse af den.

Hos Sacch. Ludwigii iagttager man hyppig, at Sporerne, medens de endnu ere indesluttede af Modercellens Væg, træde i nøje Forbindelse med hinanden, saaledes at der opstaar fritliggende Grupper, hver bestaaende af to Sporer, som paa Forbindelsesstedet ere lidt fladtrykte og her vise en tydelig Vægdannelse, 4 Sporer i en Modercelle forbinde sig paa denne Maade i Almindelighed til to Grupper. Disse ligge, som fremhævet, i Reglen frit, idet de

kun tildels udfylde Modercellen (Fig. 5 *b* og *c*). Endog i meget gamle Sporekulturer er det temmelig sjeldent at finde de under Sacch. cerevisiæ I beskrevne Skillevægdannelser (Fig. 2 *a, d, e* og *g*). Der er altsaa i den Henseende nogen Forskjel imellem de to Arter. I gamle Sporekulturer paa fugtige Gibsblokke opløses Modercellens Væg i Reglen uden at efterlade sig noget Spor; kun meget sjelden finder man en kjendelig Rest deraf. Det Tilfælde indtræder ligeledes kun undtagelsesvis, at Sporerne under disse Omstændigheder begynde at udskyde Knopper; derimod iagttog jeg ret hyppig, at flere Sporegrupper kunde blive sammenklæbede til en større Masse. I saadanne Tilfælde er det rimeligvis de opløste Modercellevægge, der særlig tjene som Bindemiddel. Sporerne ere runde og have en Størrelse af 3—4 Mikromillim. I Celler med faa Sporer saas undertiden tydeligt, at en Plasmarest var knyttet dels til Væggen, dels til Sporernes Overflade.

Ved Udsæd af unge Sporer i Ranviers fugtige Kammer med den foran omtalte fortyndede Ølurt iagttog jeg de første tydelige Tegn til Spiring efter 8 Timers Forløb (Fig. 5 *a'*), naar Dyrkningen blev foretaget ved 25° C., og efter $9^1/_2$ Time (Fig. 5 *b'*), naar Temperaturen var 18—20° C. Mange Sporer spirede dog under de samme Omstændigheder meget senere. Om Enkeltheder i disse Retninger se forøvrigt Forklaringen til Fig. 5. Ved de nærmest følgende Henvisninger tænkes bestandig paa denne Figurgruppe.

Som sædvanlig tage Sporerne ogsaa hos denne Art til i Størrelse, naar Spiringen begynder. Modercellens Væg opløses meget hurtigere end hos Sacch. cerevisiæ I, og heri haves ogsaa en Grund til, at den foran beskrevne Skillevægdannelse ikke kan fremkomme. Det er ganske umærkeligt, at Væggen forsvinder, rimeligvis omdannes den til en Slimmasse, som bidrager til at holde Sporegruppen sammen. Sporerne strække sig, og fra den Del, hvor Nydannelsen særlig finder Sted, udskydes en vorte- eller pølseagtig Forlængelse (se *c'*, *d'*, *e''*, *g'*, *h'*). Her indtræder nu to Tilfælde, idet disse Nydannelser enten hver for sig kunne voxe videre (*g—g'''''* og *h—h''''*) eller ogsaa sammensmelte med de nærliggende (se de 6 første Udviklingsrækker i Fig. 5).

Ved denne Sammensmeltning traadte i de anførte Rækker to oprindelig adskilte Sporer fuldstændig i Forbindelse med hinanden, saa at de bleve til eet eneste Legeme, omend en Del af den oprindelig adskillende Væg blev tilbage. I *a—a'''* er det de to nederste Sporer, som ere sammensmeltede, i *b—b''* begge Sporegrupperne hver for sig. Afbildningerne i *c'* og *c''*

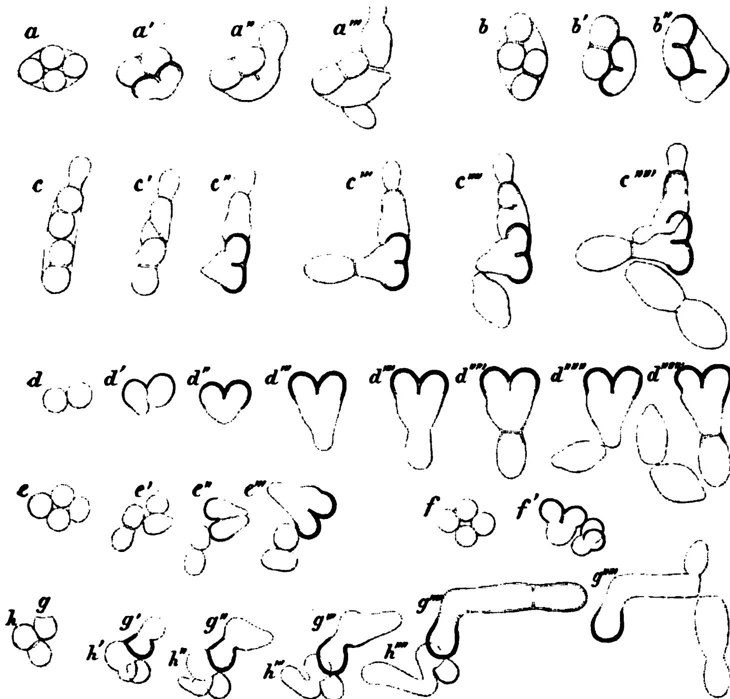


Fig. 5.

Sporernes Spiring hos *Sacch. Ludwigii.* Forstørrelsen 1000 Gange lineær. Sporerne i de tre første Udviklingsrækker ($a$—$a'''$, $b$—$b''$ og $c$—$c'''''$) stamme fra en normal Gibsblokkultur, som i fugtig Tilstand havde staaet 12 Døgn ved 25° C.; Sporerne i de fire sidste Rækker hidrøre ligeledes fra en Gibsblokkultur, men i dette Tilfælde havde denne staaet ved almindelig Stuevarme i 1½ Maaned. Dyrkningen blev foretagen i fortyndet Urt i Ranviers Kammer; Rækken $a$—$a'''$ ved 25° C., alle de øvrige ved 18—20° C. Tidsangivelserne ere bestandig regnede fra Forsøgets Begyndelse. $a$ en Celle med 4 Sporer, $a'$ efter 8, $a''$ efter 25 og $a'''$ efter 26 Timers Forløb. $b$ en Celle med 4 Sporer i to Grupper, $b'$ efter 9½, $b''$ efter 12 Timers Forløb. $c$ en pølseformet Celle, i hvis Indre 4 Sporer i to Grupper, foroven en Knop, $c'$ efter 12, $c''$ efter 15, $c'''$ efter 20, $c''''$ efter 24, $c'''''$ efter 27 Timers Forløb. $d$ to frie Sporer, $d'$ efter 18, $d''$ efter 20, $d'''$ efter 26, $d''''$ efter 28, $d'''''$ efter 29, $d''''''$ efter 30½ og $d'''''''$ efter 33 Timers Forløb. $e$ fire frie Sporer, $e'$ efter 22, $e''$ efter 26, $e'''$ efter 31 Timer. I sidstnævnte Forsøg indtager Gruppen en anden Stilling end ved Forsøgets Begyndelse. $f$ fire frie Sporer, $f'$ efter 19 Timer. $g\,h$ en Gruppe af tre Sporer, hvoraf de to nederste, $h$, have staaet i Forbindelse med hinanden, men ved Spaltning ere blevne skilte ad; den øverste Spore, $g$, har paa samme Maade afspaltet sig fra en fjerde Spore, som imidlertid ikke ses; Mærkerne af den tidligere Forbindelse iagttages endnu. $g'\,h'$ efter 17, $g''\,h''$ efter 21, $g'''\,h'''$ efter 23, $g''''\,h''''$ efter 26½, $g'''''$ efter 28 Timer. Den nederste Spore i denne Gruppe kom ikke til nogen Udvikling.

vise navnlig tydelig Sammensmeltningen mellem de to nederste Sporer. Alle Stadierne af Sammensmeltningen ere gjengivne i *d—d''* og i *e—e'''*; vi se, hvorledes Nydannelserne lægge sig op ad hinanden (*d'* og *e''*) for kort Tid derefter at sammensmelte, idet Væggene paa Berøringsstederne opløses (*d''* og *e'''*). Den Del af det saaledes opstaaede Sporelegeme, der ikke har taget umiddelbar Del i Nydannelsen, udmærker sig, som Afbildningerne vise, ved sine mere fremtrædende Omrids, og man kan ved at betragte dette Parti bestemme, hvor mange Sporer der have taget Del i Sammensmeltningen.

De sammenvoxede Nydannelser træde ofte frem i Form af en Spiretraad (*c''—c'''*, *d'''—d''''*, *e'''*), undertiden ogsaa som en Pukkel af rundladen Form (*a'—a''*). I alle Tilfælde er denne Nydannelse det Sted, hvorfra den senere Udvikling af Gjærceller foregaar; den øvrige Del af Sporelegemet forbliver uforandret. Udviklingsrækkerne *c—c'''''* og *d—d''''''* vise dette tydeligt. Hvad enten Nydannelserne optræde i den ene eller den anden Skikkelse, udvikles Gjærcellerne derfra i Form af vorte- eller pølsedannede Fremragninger, som efter at have naaet en vis Størrelse afgrænses ved en skarpt fremtrædende Tværvæg (*a'''*, *c'''*, *d''''—d''''''*). Naar den nydannede Gjærcelle løsner sig, sker dette ikke som hos de andre Saccharomyces-Arter ved en Indsnøring, men derved, at den afspaltes med skarp, lige Endeflade; først senere foregaar der en Afrunding. Jeg har allerede i min ovenfor citerede Afhandling fremhævet dette for denne Art karakteristiske Forhold. I de Tilfælde, hvor Nydannelsen har Form som en Spiretraad, er Reglen den, at der fra Spidsen af denne udvikles den ene Gjærcelle efter den anden, Væxten er altsaa i dette Tilfælde knyttet til et bestemt Parti (*c'''—c'''''*, *d''''—d''''''*). At der findes Undtagelser herfra, viser dog det Følgende. Den pukkelformede Nydannelse, hvorpaa vi have et Exempel i *a''—a'''*, udvikler Gjærceller fra forskjellige Punkter. Afspaltningen foregaar bestandig paa den ovenfor beskrevne Maade. Ogsaa de af Sporerne udviklede Gjærceller danne selv Knopper fra Endepartierne og afgrænse dem ved lige Tværvægge; dette er i et hvert Fald Reglen.

Den beskrevne Sammensmeltning af Spiretraade og af Sporer er meget almindelig; det var den Spiringsform, som var den hyppigste, naar Udsæden bestod af unge, friske Sporer. Efterhaanden som Sporerne blive ældre, hvad enten man opbevarer dem i fugtig eller i indtørret Tilstand, sker det hyppigere, at hver Spore spirer for sig uden nogen Sammensmeltning med Kamme-

raterne. I fugtige Sporekulturer, som vare 1¹/₃ Maaned gamle, fandtes dog endnu ikke faa Sporegrupper, som ved Dyrkning i fortyndet Ølurt under Spiringen dannede de i Fig 5 (*d—d''''''*, *e—e'''*, *f—f'*) afbildede Sammensmeltninger. Efter at en saadan Sporekultur var bleven anbragt paa en Platintraad i en tom Kolbe og saaledes havde været indtørret ved almindelig Stuevarme i Løbet af lidt over en Maaned, spirede derimod hver Spore for sig uden nogen Sammensmeltning. I et andet Tilfælde gik jeg ud fra en ung Kultur, hvis Sporer under Spiringen bestandig dannede de ofte omtalte Sammensmeltninger. Disse Sporer bleve paa den angivne Maade udsatte for en Indtørring i 22 Dage ved almindelig Stuevarme og derpaa paany prøvede; det viste sig da, at kun ²/₃ af de spirende Sporer nu dannede Sammensmeltninger, Resten spirede hver for sig. I Overensstemmelse hermed staar ogsaa det Resultat, som min tidligere Undersøgelse bragte (se min ovenfor citerede Afhandling). Denne blev udført med Sporer, som i indtørret Tilstand havde henstaaet 39 Dage ved almindelig Stuevarme. Under disse Omstændigheder iagttog jeg ingen Sammensmeltning. At unge Sporer kunne give et helt andet Resultat, havde jeg den Gang endnu ikke set; min daværende Opgave gik ogsaa i en helt anden Retning.

Udviklingsrækkerne *g—g'''''* og *h—h''''* vise Exempler paa det Forhold, at hver Spore danner sin særskilte Spiretraad. Denne traadte her frem som en vorteformet Udposning (*g'*, *h'*); i *h''—h''''* krummede den sig under Væxten og svulmede kølleformet op; i *g''—g'''* havde den en puklet, uregelmæssig Form og voxede derefter ud til et vinkelbøjet, traadformet Legeme (*g''''*), i hvilket derpaa en Tværvæg optraadte. I *g'''''* havde en Gjærcelle afspaltet sig paa den foran omtalte Maade og selv dannet en Knop; paa Siden af Spiretraaden var der dannet en ny Knop. Saavel den enkelte særskilte Spiretraad som Sammensmeltningerne kunne antage forskjellige Former; ogsaa i Henseende til Størrelsen og Tværvæggenes Optræden viser der sig en ikke ringe Variation. Fig. 5, 6 og 7 frembyde Exempler derpaa.

Vi have foran set, at Sporerne, medens de ere indesluttede i Modercellen, hyppig forbinde sig til Grupper med to Sporer i hver. Saalænge de ere unge, vil der som Regel finde en Sammensmeltning Sted mellem de fra en saadan Gruppe udviklede Spiretraade. Hos gamle Sporer sker dette derimod som bemærket sjelden; ofte kommer den ene Spore nemlig slet ikke til Udvikling, tidt er der ogsaa saa stor Forskjel paa Udviklingen, at den ene Spiretraad allerede kan have opnaaet en betydelig Længde, medens den

anden derimod næppe er traadt frem som en lille vorteformet Fremragning; endelig kunne to forbundne Sporer udsende en




Fig. 6.

Spirende Sporer af *Sacch. Ludwigii.* Forstørrelsen 5—600 Gange lineær. Sporerne stammede fra gamle Gibsblokkulturer; Spiringen foregik i fortyndet Urt. I *a* og *b* er der fremstillet Grupper af Sporer, i hvilke hver Spore har udviklet sin særskilte Spiretraad. *a* fremstiller Spiringens første Stadier, *b* en videregaaende Udvikling; i Gruppen *c* ses forskjellige Former af Sammensmeltningen. De gamle Sporevægge kjendes, ligesom i de foregaaende Afbildninger, paa de stærkt fremtrædende Omrids.

Spiretraad hver i sin Retning. I saadanne Tilfælde har man en Forklaring af, at en Sammensmeltning ikke indtræder, men der findes ogsaa i de gamle Sporekulturer sammenhængende Sporer, som samtidig udvikle parallelt løbende Spiretraade, uden at dog nogen Sammensmeltning indtræder; her hører, idetmindste for Øjeblikket, al Forklaring op. I Grupperne *a* og *b* Fig. 6 har jeg afbildet Exempler paa alle disse Forhold. Gruppen *a* viser os endvidere Exempler paa lange Spiretraade, som ogsaa efter Gjærcellens Afspaltning have bevaret en ret betydelig Længde, medens andre derimod under denne næsten forsvinde, idet Tverskillevægge opstaa i stor Nærhed af Sporen. I *b* er der afbildet tre Sporer med Spiretraade, hvoraf de to have udviklet sig til et grenet Mycelium, fra hvilket Gjærceller dannes[1]).

[1]) Allerede i min ovenfor citerede Afhandling: »Ueber die im Schleimflusse lebender Bäume beobachteten Mikroorganismen«, gjorde jeg opmærksom paa, at gamle Vegetationer hyppig udviklede Myceliedannelser med tydelige lige Tværvægge og kort sagt med et typisk Myceliums Udseende. Den Maade, hvorpaa de fremkom, bevirkede, at jeg nærmest maatte opfatte dem som en abnorm Dannelse. En af mine Afbildninger deraf findes i Zopfs Værk: »Die

Gruppen *c* viser forskjellige Former af Sammensmeltninger; øverst til Højre ses to Sporer, hvis sammensmeltede Spiretraade i Spidsen imod Reglen udvikle tre Knopper paa en Gang, forneden ses en Afbildning af en Sammensmeltning af tre Sporer; ogsaa fire Sporer kunne paa denne Maade træde i Forbindelse med hverandre.

Som Figurgruppen *a* viser, bestaar Sporens Væg af en enkelt Hinde, der fortsætter sig i Nydannelsen. Lignende Udviklingsformer som de beskrevne iagttog jeg ogsaa ved at dyrke Sporerne i Urtgelatine og i en Opløsning af Dextrose og Gjærvand.

Flere af de ved Sporernes Spiring efterhaanden nydannede Gjærceller udviklede i Urten i det fugtige Kammer, hvor de vare fremkomne, hurtigt Sporer i deres Indre; derimod iagttog jeg ingensinde, at dette fandt Sted i Spiretraadene.

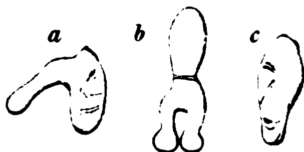



Fig. 7.

Abnorme Sammensmeltningsdannelser, fremkomne ved Spiringen af unge Sporer af *Sacch. Ludwigii.* Forstørrelsen 1000 Gange lineær.

I Fig. 7 er der afbildet nogle Sammensmeltninger, som ere lidt forskjellige fra de ovenfor omtalte. De fremkom efter 9 Timers Forløb ved at dyrke unge Sporer i fortyndet Urt ved 25° C.

I enkelte Tilfælde fandtes Sammensmeltninger som *b*, hvor to frie Sporer have udsendt hver sin Spiretraad. Efter at de to Spiretraade have voxet frit en kort Tid, ere de derpaa i Spidsen blevne sammensmeltede, og herfra er der da udviklet en Knop, som paa sædvanlig Maade er bleven afgrændset ved en lige Tværvæg. Hyppigere fandtes i den beskrevne Kultur Former som *a* og *c*, i hvilke en Celles tre eller fire Sporer ere blevne sammensmeltede mere eller mindre fuldstændigt til eet eneste Sporelegeme.

---

Pilze« (Breslau 1890) Fig. 135. Mine ovenfor meddelte Undersøgelser vise imidlertid, som vi have set, at en Myceliedannelse ogsaa hyppig kommer frem, naar gamle Sporer spire; i dette Tilfælde er der hverken Tale om noget Sygeligt eller Abnormt.

I dette Tilfælde er Sammensmeltningen begyndt paa Spiringens allerførste Stadier; de oprindelig adskillende Vægge opløses efterhaanden, en Tidlang ses Resterne deraf, men tilsidst forsvinde disse i Reglen ogsaa. Hos saadanne Sammensmeltninger kan man paa de senere Stadier ikke længer afgjøre, hvor mange Sporer der oprindelig vare tilstede. At de ogsaa kunne udsende Spiretraade ses i *a*; jeg har forøvrigt ikke forfulgt denne Form af Sammensmeltningen videre.

Det blev hidtil antaget, at Sporernes Spiring hos Slægten Saccharomyces kun foregik gjennem en Knopskydning. I de foran meddelte Undersøgelser over Sacch. Ludwigii er det imidlertid lykkedes mig at paavise nye Spiringsformer, aldeles forskjellige fra den tidligere kjendte. En Sammenligning mellem de i Fig. 3 afbildede Udviklingsrækker af Sacch. cerevisiæ I med lignende Rækker af Sacch. Ludwigii, Fig. 5 og 6, viser os paa en iøjnefaldende Maade Forskjellighederne. Hos Sacch. cerevisiæ I kan der fra ethvert Punkt af den spirende Spores Overflade udvikles Knopper, og meget hyppig dannes der paa samme Tid to eller flere (Fig. 3 *a'''*, *d'''''*, *e''''*). Under Sporernes Spiring hos Sacch. Ludwigii fremkommer derimod ikke en saadan Knopafsnøring fra selve Sporen. Nydannelsen finder kun Sted fra et Parti af denne, og har her navnlig i de Tilfælde, hvor den er bleven langstrakt, mere Karakter af Spiretraad end af Knop. Hver Spore udvikler kun een saadan Nydannelse, ligemeget om denne vedbliver at føre sit eget Liv, eller om den smelter sammen med en anden. Al den senere Udvikling foregaar herfra og ikke fra Sporen selv (Fig. 5 *a'''*, *c''—c'''''*, *d'''—d''''''*, *g'—g'''''*). I Morfologien plejer man at betegne et Mellemled af den Art som Promycelium. At det kan have forskjellig Størrelse og forskjellig Form er foran fremhævet. Med Hensyn til Sporernes Spiring udmærker Sacch. Ludwigii sig altsaa i Modsætning til alle andre hidtil undersøgte Saccharomyceter navnlig derved, at Gjærcellerne ikke udvikles direkte fra Sporen selv, men fra et Promycel. En anden vigtig Ejendommelighed er den Sammensmeltning, der som Regel finder Sted mellem de unge Sporers Nydannelser, og endelig kan det ogsaa fremhæves, at Gjærcellerne ikke frigjøres ved en Indsnøring, som hos de øvrige Saccharomyceter, men derved, at der opstaa Tvervægge og en Afspaltning.

En Sammensmeltning af spirende Konidier og deres Spiretraade er hyppig iagttaget hos forskjellige Svampe. De første Iagttagelser i den Retning skyldes vistnok Tulasne. I hans be-

rømte Værk, Selecta Fungorum Carpologia, findes navnlig i tredie Bind talrige Exempler derpaa. Saavidt jeg mindes, har man imidlertid for Ascosporernes Vedkommende ikke iagttaget noget Lignende[1]). Hos Saccharomyceterne har dette Fænomen i hvert Fald hidtil været aldeles ukjendt. Da jeg imidlertid har fundet det hos to af de Arter, der bleve underkastede en nøjere Undersøgelse, er det sandsynligt, at man efterhaanden ogsaa vil finde det hos flere. Der er dog en betydelig Forskjel paa den Maade, hvorpaa Fænomenet viser sig hos Sacch. cerevisiæ I og hos Sacch. Ludwigii. Hos den førstnævnte gjør det Indtryk af at være abnormt og sjeldent. Sammensmeltningen indtraadte mellem en Modercelles fast forbundne Sporer, idet den disse adskillende Vægdannelse efterhaanden opløstes; men dette skete først, efter at Knopskydningen var vidt fremskreden, og mellem Nydannelserne selv fandt der her slet ingen Sammensmeltning Sted (Fig. 3 $e''''$ — $e'''''$, $h'$—$h''$). Hvad der hos Sacch. cerevisiæ I staar som en Undtagelse, er derimod hos Sacch. Ludwigii hyppigt, og har idetmindste under visse Livsforhold vist sig at være Reglen. Hos denne foregaar, som det blev fremhævet, Sammensmeltningen tilmed paa en hel anden Maade, her er det netop Nydannelserne, der strax smelte sammen (Fig. 5 $d$—$d''$, $e$—$e'''$). En Betragtning af de citerede Figurer viser bedre end lang Beskrivelse den betydelige Forskjel, der er mellem Sammensmeltnings-Fænomenerne hos de to Arter.

Hvilken biologisk Betydning de beskrevne Sammensmeltnings-Dannelser maatte have, derom kan jeg for Øjeblikket ingen sikre Oplysninger give. Hos Sacch. cerevisiæ I synes den, som foran berørt, at bestaa deri, at den ene Spore søger Næring hos den anden for at kunne tilfredsstille de Krav, som Dannelsen af nye Knopper stille; Forholdet vilde da her være at opfatte som en Art Parasitisme. Da Sammensmeltningen hos Sacch. Ludwigii, som vi have hørt, imidlertid er af en hel anden Art, passer denne Forklaring slet ikke her. Maaske kan Sammensmeltningen i dette Tilfælde tjene til at sætte Sporerne i Stand til at udvikle et forholdsvis større Antal Gjærceller. I saa Fald vilde da ogsaa af den Grund de unge, friske Sporer have større Udsigt til at kunne give en rigere Vegetation end de gamle. Som en virkelig Kopulation kan den næppe opfattes.

---

[1]) En Oversigt over de hidtil udførte Undersøgelser i den nævnte Retning findes i Zopfs Haandbog »Die Pilze« (Breslau 1890): Fusionsbildungen p. 115.

### 4. Saccharomyces anomalus nov. spec.

Med dette Navn foreslaar jeg at betegne en ny, i flere Henseender meget ejendommelig Art, der fandtes i en uren Bryggerigjær, som jeg for nogle Aar siden modtog fra Bayern.

I Urt giver den hurtig Gjæring saavel ved almindelig Stuevarme som ved 25° C. Strax ved Gjæringens Begyndelse, medens Luftblærer i rigelig Mængde stige op til Overfladen, dannes her en mat, graa Hinde, og i den Henseende minder den altsaa meget om min Monilia candida. Vædsken bliver under Gjæringen uklar, i Reglen noget opaliserende, og faar en stærk Lugt af Frugtæther. Det mikroskopiske Billede af Cellerne minder nærmest om flere af de Torula-Arter, som jeg har behandlet i forskjellige Afhandlinger; efter Udseendet at dømme vilde man ogsaa snarere henføre den hertil end til Slægten Saccharomyces. Under de beskrevne Forhold optræder den med smaa Gjærceller, i Almindelighed af oval, undertiden dog ogsaa af pølsedannet Form, og naar Udviklingen har varet en Tid, findes der saavel i Hinden som i Bundgjæren temmelig talrige Celler med Endosporer. Mellem Hindens Celler er der en rigelig Indblanding af Luft.

I Vandudtræk af Kirsebær, Æbler, Kartoffelplanter og Kogjødning udvikledes der kun Vegetationer som de foran beskrevne; det Samme var ogsaa Tilfældet, naar Dyrkningen fandt Sted i Agar-Pepton og i Næringsgelatiner, hvortil der i nogle Tilfælde var sat Urt, i andre Dextrose og Gjærvandsafkog og atter i andre Afkog af Hatten af Agaricus (Armillaria) melleus. Den sidstnævnte Næringsgelatine blev benyttet, fordi Sacch. anomalus, som vi ret snart skulle høre, ved sine Sporer minder meget om Endomyces decipiens, der af De Bary netop blev funden paa Lameller af den nævnte Hatsvamp. Dyrkningen blev fortsat flere Maaneder saavel ved almindelig Stuevarme som ved 25° C., men der optraadte kun de omtalte Gjærceller og Endosporer.

Det blev ovenfor meddelt, at den i Urt fremkalder stærk Gjæring med Ætherdannelse; Gjæringsprodukterne har jeg endnu ikke nærmere undersøgt, ej heller om Maltosen angribes eller ej. I en Opløsning af Lactose i Gjærvand fremkalder den ingen Gjæring.

Paa dette Sted er det Sporerne og disses Spiring, hvormed vi skulle beskjeftige os. Vi have ovenfor hørt, at de udvikle sig paa forskjellige Næringssubstrater, saavel flydende som faste, og dette sker ogsaa under Forhold, hvor Modercellerne have rigelig Adgang til Næring. I en sædvanlig Gibsblokkultur ved 25° C. var

der endnu intet Tegn til Sporedannelse efter 24 Timer, medens der efter 40 Timer fandtes en temmelig rig Udvikling.

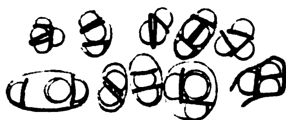


Fig. 8.

Sporer af *Sacch. anomalus.* Forstørrelsen 1000 Gange lineær. Nogle ere frie, andre indesluttede i Modercellerne. Nederst til Højre ses en sprængt Modercellevæg, der endnu omslutter tre Sporer.

I hver Modercelle findes 2—4 Sporer, og de kunne, som Fig. 8 viser, være ordnede paa forskjellig Maade. Sporen selv er mere eller mindre halvkugleformet med en fremspringende Liste fra Grundfladen; selve Grundfladens Diameter, altsaa Listen ikke medregnet, er 2—3 Mikromillim.

Modercellens Væg er meget skrøbelig, og man finder derfor hyppig saadanne sprængte Hinder. Endog i meget gamle Sporekulturer iagttog jeg intet Tegn til den foran ofte omtalte Skillevægdannelse. Hvis den overhovedet optræder hos denne Art, hører den i hvert Fald til Sjeldenhederne.

Studiet af Sporernes Spiring hos Sacch. anomalus er forbundet med særlige Vanskeligheder. Hos unge Sporer lykkedes det mig kun ufuldstændig at iagttage denne Udvikling. Ved derimod at udsaa gamle Sporer enkeltvis, uden Indblanding af vegetative Celler, i Ranviers fugtige Kammer med fortyndet Ølurt og ved at foretage Dyrkningen ved 22—28° C., kunde jeg Skridt for Skridt følge Udviklingen af de i Fig. 9 afbildede tre Rækker. I *a*—*a''''* og *c*—*c'''* har Sporen under Spiringen bevaret sin hele Form, i *b*—*b'''''* har den derimod mistet den fremspringende Liste. Som disse Afbildninger vise, bestaar Spiringen deri, at Sporen svulmer og derpaa efterhaanden fra forskjellige Punkter af sin Overflade udskyder Knopper, hvilke derefter atter selv formere sig ved Knopskydning. I Løbet af et Døgn kan man paa den Maade med en enkelt Spore som Udgangspunkt faa en lille Vegetation af Gjærceller. Om Enkelthederne vedrørende de tre nævnte Udviklingsrækker henvises til Forklaringen af Fig. 9.

Unge Sporer, som stammede fra en Gibsblokkultur, der havde staaet 2 Døgn ved 25° C., bleve udsaaede i Urtgelatine (ca 5 % Gelatine) i et fugtigt Kammer ved 25° C. Af 10 Sporegrupper spirede kun den ene, og heri atter kun een af Sporerne. Knopskydningen viste sig som i Fig. 9 *a'* og naaede ikke videre. Ogsaa

ved at dyrke Sporerne i Vand har jeg en sjelden Gang set en enkelt Spore spire og kun paa den beskrevne Maade. Sporernes Spiring foregaar med mindre Vanskelighed, naar de ligge enkeltvis, end naar de ligge i Grupper. Man gjør derfor rettest i først at udbløde dem i Vand og derefter i hvert Kammer kun at anbringe een eller i hvert Fald meget faa Sporer.

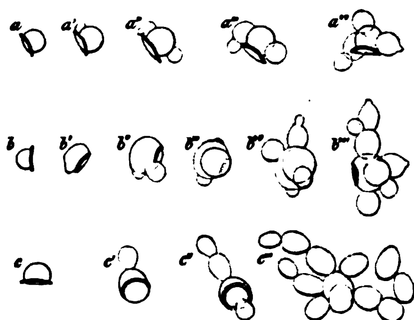


Fig. 9.

Sporernes Spiring hos *Sacch. anomalus.* Forstørrelsen 1000 Gange lineær. Udsæden stammede fra en flere Maaneder gammel og delvis indtørret Gibsblokkultur. Dyrkningen foretoges i fortyndet Urt i Ranviers fugtige Kammer: *a*—*a''''* ved 28° C., *b*—*b'''''* og *c*—*c'''* ved 28° C. Nedenstaaende Tidsangivelser ere bestandig regnede fra Forsøgets Begyndelse. *a* en Spore med Grundfladen vendt til Venstre. *a'* efter 7, *a''* efter 12, *a'''* efter 15 og *a''''* efter 20 Timer. *b* en Spore med Grundfladen vendt til Højre, *b'* efter 10, *b''* efter 21, *b'''* efter 24, *b''''* efter 25, *b'''''* efter 27 Timer. I sidstnævnte Afbildning er Sporens Stilling en anden end i de foregaaende Afbildninger. *c* en Spore, hvis Grundflade er vendt nedad, *c'* efter 8, *c''* efter 10, *c'''* efter 21 Timer.

Under de beskrevne Dyrkningsforhold foregik Sporernes Spiring altsaa bestandig ved en Knopskydning, hvorved der blev dannet Gjærceller af samme Art som dem, der i deres Indre havde udviklet Sporerne. Den Mulighed er naturligvis ikke udelukket, at der under andre Forhold kan udvikles Spiretraade, men hidtil ere saadanne som sagt ikke iagttagne.

De beskrevne Sporer afvige i deres Form meget fra de fleste andre Saccharomyces-Arters, kun med Sacch. membranæfaciens er der i den Henseende nogen Lighed. I en Fortsættelse af de nærværende Studier agter jeg ogsaa at give en Undersøgelse af den sidstnævnte Arts Sporer og Spiringsforhold, ledsaget af de fornødne Afbildninger; jeg skal derfor her ikke gaa nærmere ind derpaa.

Sporerne af Sacch. anomalus have den selvsamme Form som Sporerne af Endomyces decipiens. Denne interessante Art blev af

De Bary fundet paa Lameller af Agaricus (Armillaria) melleus, paa hvilke den ifølge hans Beskrivelse[1]) dannede et hvidt Filtlag, bestaaende af grenede Mycelietraade med eller uden Tværvægge. Naar disse Traade kom i Vand, oploestes de let i deres enkelte Led. Til Siderne udviklede de pæreformede Sporesække, i hvis Indre der dannedes 4 eller meget sjeldent 5 Sporer. Disse have, som foran bemærket, den samme Form som de i min Fig. 8 afbildede, men ere over dobbelt saa store. Det lykkedes ikke De Bary at bringe dem til at spire; efter Reess sker dette ved Spiretraade, altsaa ikke ved Knopskydning[2]).

I 1885 beskrev Fayod en ny Art af den nævnte Slægt, nemlig Endomyces parasiticus[3]). Han fandt den paa Lamellerne af Agaricus (Tricholoma) rutilans. I de vigtigste Bygningsforhold stemmer den overens med den foregaaende Art, men adskiller sig i Henseende til Sporernes Form og Størrelse dog tilstrækkelig fra den til at kunne opfattes som en ny Art. Dens Sporer ere nemlig ikke blot kjendelig mindre end Sporerne hos Endomyces decipiens, men de ere ved deres Tenform aldeles forskjellige derfra. Fayod fandt kun en Gang den af ham beskrevne Endomyces, og uagtet han senere underkastede en stor Mængde Agaricineer fra forskjellige Voxesteder en nøjagtig Undersøgelse, var det ham dog ikke muligt at finde hverken denne eller nogen anden Endomyces-Art.

Sporerne af min nye Art, Sacch. anomalus, stemme, som vi ovenfor have hørt, i deres Form fuldstændig overens med Sporerne hos Endomyces decipiens; de ere kun betydelig mindre. Mere væsentlige Forskjelligheder mellem de to Arter viste sig deri, at Sacch. anomalus kun udviklede de beskrevne Gjærceller og Endosporer, men aldrig et Mycelium, og at dens Sporers Spiring bestod i en sædvanlig Knopskydning, hvorved nye Gjærceller udvikledes, medens der ved Sporernes Spiring hos Endomyces decipiens dannedes en Spiretraad og ikke Gjærceller. At disse Forhold under forandrede Dyrkningsvilkaar kunne stille sig noget anderledes, er dog, som foran bemærket, ikke usandsynligt; hertil kommer, at Endomyces decipiens ikke har været underkastet nogen Undersøgelse i Løbet af de sidste tyve Aar. Det kan saaledes være rimeligt

---

1) De Bary, Zur Kenntniss einiger Agaricineen. (Botan. Zeitung, 1859, p. 401.)

2) Reess, Botan. Untersuchungen über die Alkoholgährungspilze, 1870, p. 77.

3) Fayod, Notes sur quelques champignons parasites nouveaux ou peu connus. (Annales des Sciences Nat. Septième Série. Botanique, T. 2, 1885, p. 28.)

nok, at en Undersøgelse fra nye Synspunkter ogsaa vilde bringe nye Oplysninger frem.

Endomyces decipiens har en særlig Interesse derved, at den, som Reess har fremhævet, synes at staa Saccharomyceterne nær. Af disse Grunde søgte jeg og mine mykologiske Venner med megen Iver efter denne Svamp i Løbet af Efteraaret, men uden at opdage den. Overordentlig hyppig fandt jeg Exemplarer af Agaricus (Armillaria) melleus, hvis Lameller vare bedækkede med en Oidiumform, men Mycel med Sporesække iagttoges ikke, ej heller efter at jeg i Løbet af flere Maaneder paa forskjellig Maade havde dyrket den omtalte Oidium. Det selvsamme Resultat gave de Prøver, som Prof. Dr. F. Ludwig godhedsfuldt sendte mig fra Thüringen. Om den af mig omtalte Oidium hører til Endomyces decipiens eller ej, kunne de anstillede Undersøgelser selvfølgelig ikke afgjøre. Hovedresultatet er, at det hidtil ikke har været mig muligt at erholde den sidstnævnte Art. Skulde nogen af mine Læsere være i Stand til at sende mig levende Exemplarer deraf, vil jeg være meget taknemmelig derfor.

## 5. Tilbageblik.

I Indledningen (p. 53—55) blev der givet en Oversigt over den Literatur, der findes om Sporerne hos Saccharomyceterne: Schwann 1839, J. de Seynes 1868, Reess 1870, Emil Chr. Hansen 1883—1890.

Om Spiringen meddelte Reess Følgende: Sporerne svulme og udfylde herved aldeles Modercellen, saa at dennes Væg enten brister eller kommer til at slutte sig tæt om Døtrecellerne; den egentlige Spiring bestaar deri, at Sporerne udskyde knopformede Udposninger, som derpaa voxe ud til lignende Gjærceller som dem, i hvis Indre de selv oprindelig bleve dannede. Reess mener, at Spiringen foregaar paa denne Maade hos alle Slægtens Arter.

De følgende Kapitler handle om de Undersøgelser, som jeg har anstillet over Sporernes Spiring, navnlig hos de tre Arter: Sacch. cerevisiæ I, Sacch. Ludwigii og Sacch. anomalus I Modsætning til mine Forgængere forfulgte jeg alle Spiringsstadierne hos en og samme Spore, idet jeg nemlig foretog Dyrkningen i et fugtigt Kammer paa Mikroskopbordet.

Forsøgene med Sacch. cerevisiæ I (p. 55—62) lære os, at Sporerne paa Spiringens første Stadier kunne svulme saaledes, at der ved det Tryk, som de udøve paa hverandre, medens de endnu befinde sig i Modercellen, fremkommer Skillevægdannelser.

Herved presses en større eller mindre Mængde Plasma sammen som Kiler eller Plader mellem Sporerne, eller ogsaa træde disses Vægge selv i inderlig Berøring med hverandre. Dette kan gaa saa vidt, at en fuldstændig Sammenvoxning finder Sted, hvorved der altsaa opstaar en virkelig Skillevægdannelse (Fig. 2 *g*).

Modercellevæggen, som oprindelig er temmelig tyk og elastisk, udspændes under Spiringen i høj Grad, og samtidig hermed bliver den tyndere og finere. Naar Sporernes Knopskydning begynder, kan den enten sprænges eller umærkelig opløses. Sprængte Vægge iagttoges som foldede, rynkede, tynde Hinder, der lig et Slør delvis indhyllede de Sporer, som de kort forinden havde indesluttet (Fig. 3 *b'*, *c'—c''*, *d'''—d'''''*).

Knopperne kunne komme frem paa ethvert Punkt af Sporernes Overflade, og undertiden medens disse endnu befinde sig inde i Modercellen (Fig. 4 *g* og *i*). Efter Knopskydningen vedblive Sporerne hyppig at staa i Forbindelse med hverandre, men de kunne ogsaa da hurtig skilles ad.

Fig. 3 *e—e'''''* og *h—h''* viser os det interessante Forhold, at Vægdannelsen mellem to sammenstødende Sporer er bleven opløst, saa at deres Indhold herved er blevet sammenblandet. Den ene Spore synes i dette Tilfælde at optræde som Parasit overfor den anden.

Medens der hos Sacch. cerevisiæ I kun undtagelsesvis blev iagttaget en Sammensmeltning, er en saadan derimod almindelig hos Sacch. Ludwigii (p. 62—70), naar dennes unge Sporer spire, men den foregaar her paa en hel anden Maade. Hos Sacch. cerevisiæ I optraadte den først, efter at vedkommende Sporer havde begyndt deres Knopskydning, og den fandt ingensinde Sted mellem Nydannelserne; hos Sacch. Ludwigii viste Sammensmeltningen sig derimod paa Spiringens allerførste Stadier, og hos denne Art var det netop Nydannelserne selv, der voxede sammen (Fig. 5—7). Herved opstaa ofte meget paafaldende Former, navnlig naar flere end to Sporer smelte sammen.

Med Hensyn til Sporernes Spiring adskiller Sacch. Ludwigii sig desuden fra alle andre hidtil undersøgte Saccharomyceter derved, at Gjærcellerne ikke udvikles direkte fra Sporerne selv, men fra et Promycel (Fig. 5 og 6).

Sporerne hos Sacch. anomalus (p. 71—75) ere, som Fig. 8 viser, mærkværdige ved deres Form og i den Henseende forskjellige fra de andre Saccharomyceters. Da de aldeles ligne Sporerne hos Endomyces decipiens, havde det en særlig Interesse at undersøge, om Spiringen foregaar som hos denne ved en Spiretraad-

dannelse eller som hos de fleste Saccharomyceter ved en Knopskydning. Vi have ovenfor set, at det Sidste er Tilfældet.

Af de i denne Afhandling behandlede tre Arter lader kun Sacch. cerevisiæ I sig indordne under den af Reess i 1870 opstillede Ramme for Slægten Saccharomyces, de to andre derimod ikke. Sacch. anomalus indtager en Særstilling paa Grund af sine Sporers ejendommelige Form, Sacch. Ludwigii navnlig derved, at den ved Sporernes Spiringsmaade adskiller sig fra alle de øvrige. En anden vigtig Ejendommelighed hos den sidstnævnte Art viser sig i den Maade, hvorpaa Gjærcellerne frigjøres fra Modercellen; dette sker nemlig ikke som sædvanlig ved en Indsnøring, men derved, at der opstaa Tværvægge, hvorpaa en Afspaltning finder Sted. Efter Adskillelsen har saavel Moder- som Dattercellen skarpt afskaarne, plane Brudflader, og først senere blive de afrundede. Sacch. Ludwigii hører ligeledes til de Arter, hos hvilke jeg har paavist en Myceliedannelse. Trods Alt dette er det dog rigtigt indtil videre ogsaa at henføre begge de to sidst omtalte Arter til Slægten Saccharomyces, men saaledes, at de opstilles som Repræsentanter for særegne Grupper. Vi have set, at de i nærværende Afhandling meddelte Undersøgelser paa flere Punkter give helt nye morfologiske og udviklingshistoriske Oplysninger, og de aabne Udsigten til at erholde endnu flere; paa vort nuværende Standpunkt vil det derfor ikke være tilraadeligt at indføre nye Slægtnavne.

Navnlig med Hensyn til Sacch. Ludwigii kommer det Spørgsmaal frem, om den ikke kunde høre til en højere Svamps Udviklingskreds. Enhver, der har beskjeftiget sig med Mykologiens Historie, ved, at med Mellemrum er den Paastand atter og atter traadt op, at Saccharomyceterne ikke ere selvstændige Svampeformer, men kun Udviklingstrin af andre Arter; man har snart gjættet paa den ene, snart paa den anden Mulighed. Efter at navnlig Bail, Hoffmann og Berkeley for noget over tredive Aar siden havde kæmpet for den Anskuelse, at Saccharomyceterne skulde henhøre til vore almindelige Skimmelsvampe, er den samme Ide, om end i en lidt anden Form, paany bragt frem af Pasteur (1876), af Sachs (1882) og i den nyeste Tid af Brefeld. Beviser for, at vor gamle Opfattelse i den nævnte Retning er urigtig, fik vi dog ikke, og ej heller nogen Oplysning om, hvor vi kunne finde de med saa stor Iver søgte højere Stamformer. En væsentlig Grund til den Forvirring, som efterhaanden opstod, var i mange Tilfælde den, at der ikke blev skjelnet mellem de ægte Saccharomyceter (Gjærceller med endogen Sporedannelse) og de talrige Gjærformer, som vel formere sig ved Knopskydning ligesom de foran nævnte,

men som i Modsætning til disse mangle Evne til i deres Indre at udvikle Sporer. Om disse Ikke-Saccharomyceter vide vi allerede fra de gamle Undersøgelser af Bail (1857), Tulasne (1863), De Bary (1866) og Reess (1870), at de henhøre til forskjellige Afdelinger i Systemet; de have imidlertid her, hvor Spørgsmaalet udelukkende drejer sig om de ægte Saccharomyceter, ingen Interesse for os.

De eneste Kjendsgjerninger, som for Øjeblikket kunne tyde paa, at de ægte Saccharomyceter muligsvis ikke ere selvstændige Former, skyldes mine Dyrkningsforsøg. Ved disse har jeg i de senere Aar paavist, at ikke blot Sacch. Ludwigii, men ogsaa nogle andre Arter kunne udvikle et typisk Mycel. Disse og andre Resultater, som mine Undersøgelser have bragt, ere vel af en saadan Art, at vi ikke længer kunne fastholde den af Reess givne Definition af Slægten, men de tvinge os ingenlunde til helt at opgive denne og endnu mindre til den Opfattelse, at Saccharomyceterne kun ere Udviklingsformer af andre, højere stillede Svampe. Der er, som sagt, talt og skrevet meget, frem og tilbage, om disse Spørgsmaal. For nogle Aar siden kunde endnu saadanne Diskussioner fra Mulighedernes store Rige have lidt Værdi, men dette er ikke længer Tilfældet. Nu ønske vi paa dette Omraade kun Kjendsgjerninger og nøjagtige Beviser.

December 1890.

---

# Om Cholin som Bestanddel af Øl.

Af

J. Kjeldahl.

Naar man til Urt eller Øl sætter en Opløsning af Jod i Jodkalium i ringe Mængde, fremkommer der et yderst fint fordelt, rødbrunt Bundfald, der kun meget langsomt sætter sig, næppe lader sig frafiltrere og i det Hele ikke indbyder til nærmere Undersøgelse. Det bestaar utvivlsomt af Jodforbindelser af æggehvideagtige Stoffer. Tilsætter man derimod et stort Overskud af Jodopløsningen, udskiller der sig ved kort Henstand en ret anselig Mængde pragtfuldt canthárideglindsende Krystalnaale. Denne Reaktion kan fremkaldes med nogle faa Draaber Øl og fremkommer selv, efter at dette er fortyndet mange Gange med Vand. Forbindelsen er, som det fremgaar af det nys omtalte, fuldstændig uopløselig i Jod-Jodkalium, hvorimod den er lidt opløselig i rent Vand. Opvarmet i Vand smelter den let og stivner ved Afkøling til en storkrystallinsk Masse; en Prøve heraf smeltede ved 49°.

Det laa nær at antage denne Forbindelse for et Perjodid af en organisk Base, og blandt disse maatte Opmærksomheden atter nærmest henledes paa Cholin som Spaltningsprodukt af det i alle dyriske og vegetabilske Organer saa vidt udbredte Lecithin. Der fandtes imidlertid ingen Angivelse om, at denne, iøvrigt ret ofte studerede Forbindelse, kunde danne et Perjodid af den omtalte Beskaffenhed. Griess og Harrow[1]) have vel paavist Cholin i ringe Mængde (ca 1 : 5000) i Humle, idet de fældede Basen af Vandudtrækket med Jod-Jodkalium. Men det af dem beskrevne Perjodid var tjæreagtigt og havde saaledes ingen Lighed med det

[1]) Journal of the Chemical Society, 1885, S. 298.

her omtalte. Brieger[1]) angiver, at Cholinchlorid med Jod i Jodkalium giver et brunt, kornet Bundfald.

For nærmere at prøve dette Forhold, blev der fremstillet Cholinchlorid af 10 Æggeblommer, som bleve udtrukne med Æther og derefter, ved 40—50°, med absolut Alkohol. Af Udtrækkene afdestilleres Opløsningsmidlerne, de 2 Residuer forenes og koges i en Time med koncentreret Barytvand. Efter Filtration fældes Overskudet af Baryt med Kulsyre, Filtratet fra den kulsure Baryt inddampes til Tørhed og udtrækkes med absolut Alkohol. Denne Opløsning fældes med en Opløsning af Brintplatinchlorid i absolut Alkohol, Platinsaltet opløses i Vand og Platinet udfældes med Svovlbrinte. Den saaledes vundne Opløsning af Cholinchlorid forholdt sig nu mod Jod-Jodkalium ganske paa den nys omtalte Maade, idet den selv ved meget stærk Fortynding (indtil 1 : 4000000) dermed gav et krystallinsk Bundfald, der fuldstændig lignede det foran beskrevne og blandt andet ogsaa viste det samme Smeltepunkt. Forbindelsen vil findes nærmere omtalt i den efterfølgende Afhandling om Cholinet og dets Homologe af R. Koefoed, hvis Analyse førte til det Resultat, at det var et Enneajodid $[(CH_3)_3(C_2H_4 . OH)N] . J . J_8$. Sammesteds vil man ogsaa finde nærmere Meddelelse om det flydende Perjodid, der let opstaar af Enneajodidet, og som synes at være et Pentajodid, i Almindelighed dog med et Overskud af Jod.

Efter at saaledes Forekomsten af Cholin i Urt og Øl maatte anses for højst sandsynlig, gik jeg over til at isolere Forbindelsen af disse Vædsker. Ihvorvel Fældningen ved Jodopløsning lod sig foretage direkte i Urten, maatte det dog, af Hensyn til det overordentlig store Forbrug af Jod, anses for hensigtsmæssigt, at søge deraf at fremstille en Opløsning, hvori Cholinet forekom i forholdsvis større Mængde og mindre blandet med andre Stoffer. Jeg inddampede derfor en større Mængde Pururt omtrent til dens halve Rumfang, tilsatte efter fuldstændig Afkøling Kalkmælk i Overskud, og umiddelbart derefter 1—2 Maal Vinaand. Herved bundfældes bl. a. næsten den hele Mængde af Kulhydrater. Den vinøse Opløsning frafiltreres, gjøres svag sur med Svovlsyre og inddampes paa Vandbad, efter Tilsætning af kulsur Baryt, indtil al Vinaand er gaaet bort. Den filtrerede Opløsning indeholder nu alt Cholinet, foruden Omdannelsesprodukter af Æggehvidestoffer og ringe Mængder af andre Bestanddele, og egner sig fortrinligt til Bundfældning med Jodopløsning. Det er dog ikke hensigtsmæssigt

[1]) Untersuchungen über Ptomaïne, I, S. 38.

at foretage denne Fældning i den stærkt koncentrerede Opløsning, da der herved dannes det tjæreagtige Jodid, som volder nogle Vanskeligheder ved den paafølgende Behandling. Selv ved betydelig Fortynding giver denne Opløsning imidlertid et overordentlig smukt Bundfald af Perjodid, ligesom ogsaa den Jodmængde, der udkræves til Cholinets fuldstændige Bundfældning, her synes at være betydelig ringere, end naar Fældningen foretages paa den oprindelige Urt. Perjodidet vaskes med saa lidt Vand som muligt, og dekomponeres derefter med Svovlsyrlingvand. Tilsætter man strax et Overskud heraf, opløses Perjodidet med det samme; tilsættes derimod Svovlsyrlingen i smaa Portioner, smelter Forbindelsen, og man maa varme efter hver Tilsætning af Svovlsyrling, indtil Vædsken igjen farves brun, idet det flydende Perjodid naturligvis langsommere paavirkes. I den filtrerede Opløsning indføres nu Chlor istedetfor Jod ved Rystning med frisk fældet Chlorsølv; før denne Behandling maa Vædsken neutraliseres saa nøjagtig som muligt, idet den paagjældende Reaktion da foregaar langt lettere og med mindre Mængde af Chlorsølv. At den er tilende, kjendes paa, at en filtreret Prøve ikke mere giver mørk Farve med Brintplatinchlorid ved Opvarmning. Filtratet inddampes derpaa til Tørhed, og Resten udtrækkes med kogende, absolut Alkohol. Efter Afkøling fældes dette Udtræk med en vinøs Opløsning af Brintplatinchlorid. Platinsaltet vaskes med absolut Alkohol, opløses i Vand og Platinet fældes ved en i flere Timer fortsat Tilledning af Svovlbrinte. Af Filtratet fra Svovlplatinet udkoges Svovlbrinten fuldstændigt, hvorpaa Opløsningen neutraliseres og inddampes til lille Rumfang. Der udskilles da endnu nogle brune Fnug, der frafiltreres. Ved Tilsætning af Brintguldchlorid vil snart det for Cholinet saa karakteristiske, tungt opløselige Aurichlorid begynde at udkrystallisere; ved Afkøling forøges Mængden heraf betydeligt. Saltet opløses paany i varmt Vand, Opløsningen filtreres fra lidt udskilt Guld og inddampes atter til Krystallisation. Krystallerne samles paa et Pimpstensfilter, vaskes med saa lidt Vand, som muligt, og tørres i tør Luftstrøm paa Filtret. Ved yderligere 2 Dages Henstand i Exsiccatoren havde de ikke forandret deres Vægt. Det er af Vigtighed, før Tilsætningen af Brintguldchloridet, at inddampe, til det omtalte, brune Bundfald havde udskilt sig; før dette iagttoges, krystalliserede Aurichloridet meget vanskeligt. Guldmængden bestemtes i 3 Prøver ved Glødning:

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| I. | 0,3890 | Gm. Guldsalt gav | 0,1725 | Gm. Guld | ɔ: 44,35 %. |
| II. | 0,4305 | - - - | 0,1914 | - - | ɔ: 44,45 - |
| III. | 0,6402 | - - - | 0,2842 | - - | ɔ: 44,40 - |

(beregnet for Cholinguldchlorid, $C_5 H_{14} NO . Au Cl_4$: 44,44 % Guld).

Hermed turde Idenditeten af den af Ølurt fremstillede Base med Cholin være tilstrækkelig godtgjort.

Jeg skal nu kortelig omtale nogle af de kvantitative Cholinbestemmelser, jeg har udført. Det var herved først og fremmest af Vigtighed at forvisse sig om, hvorvidt Fældningen af Cholin med $H_2 PtCl_6$ i vinøs Opløsning var fuldstændig. I den Hensigt inddampes Filtratet fra en slig Fældning til Tørhed, Residuet opløses i Vand og Opløsningen befries for Platin med Svovlbrinte. Efter Bortkogning af Svovlbrinten fortyndes Vædsken med Vand og blandes med Jodopløsning. Selv ved 24 Timers Henstand fremkom der intet Spor af Krystaller; Fældningen med $H_2 PtCl_6$ har altsaa været kvantitativ.

Mængden af Cholin i Øl og Urt ansloges til omtrent $^1/_{10}$ Gm. pr. Liter, saavidt det lod sig skjønne efter Mængden af Perjodid, sammenlignet med det, som fremkom i Cholinopløsninger af bekjendt Styrke. $2^{ccm}$ af en Cholinchloridopløsning, der indeholdt 0,0758 Gm. Cholin, fortyndedes til $750^{ccm}$ og skulde altsaa nu repræsentere en Cholinopløsning af omtrent samme Koncentration som Urt. Opløsningen fældes med $60^{ccm}$ Jodopløsning; den ved dette og alle følgende Forsøg anvendte Opløsning tilberedtes ved at opløse 1 Del Jod med $1^1/_2$ Dele Jodkalium og lidt Vand; naar alt Jod er opløst, tilføjes mere Vand, indtil man ialt har 10 Dele heraf. Efter Henstand filtreres Perjodidet paa et Asbestfilter, vaskes med fortyndet Jodopløsning, sønderdeles med Svovlsyrlingvand, Opløsningen neutraliseres, behandles med Chlorsølv, filtreres, inddampes til Tørhed, Resten udkoges med absolut Alkokol og fældes med vinøs $H_2 PtCl_6$. I 2de Forsøg fandtes ved Glødning af Platinsaltet

| | | | |
|---|---|---|---|
| I. | 0,0593 Pt. | = | 0,0736 Cholin |
| II. | 0,0638 - | = | 0,0792 - |
| | Middel | = | 0,0764 Cholin, |
| | | | istedetfor 0,0758. |

Det fremgaar heraf, at Cholin, igjennem Fældning i Form af Perjodid, lader sig bestemme med ret stor Nøjagtighed, endogsaa i meget fortyndede Opløsninger.

Ved Urt og Øl maa man imidlertid anvende et endnu langt større Overskud af Jod, forat Fældningen skal blive fuldstændig. I Almindelighed blandedes saaledes den til Undersøgelse bestemte Vædske med sit lige Rumfang Jodopløsning af den før omtalte Styrke. Perjodidet frafiltreredes den følgende Dag og udvaskedes med $10^{ccm}$ Jodopløsning, fortyndet med $90^{ccm}$ Vand. Det blev der-

efter ad den tidligere beskrevne Vej omdannet til Platinsaltet, der blev vejet efter Tørring ved 100°. I Regelen blev til Kontrol Bundfaldet opløst paa Filtret i Vand, inddampet i Platinskaal og tørret ved 100°. Vægten af Platinsaltet var da ofte ganske den samme som paa Filtret, undertiden 1 mgm. lavere. Ved forsigtig Glødning skal det efterlade en Rest af Platin paa 31,63 %. I Almindelighed fandtes Tal, der stemmede godt overens hermed, dog hændte det af og til, at Platinmængden faldt for højt ud. Muligvis kan dette skyldes et Indhold af den tilsvarende Trimethylaminforbindelse $[N(CH_3)_3H]_2PtCl_6$, der giver 36,91 % Platin. Da der ved saa stort Jodforbrug ikke vel lod sig arbejde med større Rumfang Urt, forsøgte jeg her at anvende den samme Modifikation i Methoden, som jeg havde bragt til Anvendelse ved Paavisning af Cholinet, nemlig Bortfjernelse af Kulhydraterne med Kalkmælk og Vinaand. Den hertil anvendte Kalkmælk indeholdt 15 Gm. CaO paa 100 Gm. Af Grunde, som vil fremgaa af det Efterfølgende, blev der lagt Vægt paa, at Tilsætningen af Vinaand fandt Sted saa hurtig som muligt, efter at Kalkmælken var rørt ud i den inddampede og derpaa stærkt afkølede Urt. Det mægtige Bundfald, der herved dannes, bliver under Vinaanden snart skjørt og er derefter let at findele og udvaske med fortyndet Vinaand, naar man dertil anvendte et passende Filtrerapparat. Ved denne Behandling opnaar man at faa en Opløsning, hvoraf de fleste Stoffer, som foruden Cholin fældes af Jod, ere fjernede. Derimod er det, som før berørt, ikke hensigtsmæssigt herigjennem at søge at skaffe sig en mere koncentreret Cholinopløsning, da man med en saadan jo let faar noget tjæreagtigt Perjodid, der længe modstaar Indvirkningen af Svovlsyrlingen. Jeg har endog fundet det tjenligst, efterat Opløsningen var befriet for Vinaand og filtreret fra Barytsaltene, at fortynde den til samme Rumfang som den oprindelige Urt. Den blev ikke desto mindre fældet fuldstændigt ved langt mindre Jod end denne, og Bundfaldet var nu af en særdeles smuk krystallinsk Beskaffenhed[1]).

---

[1]) Til Filtration af Perjodidet, af den fra Vinaand befriede Opløsning og af den med Chlorsølv behandlede Vædske, men, fremfor Alt, til Filtration og Udvaskning af det store Kalkbundfald, lader sig med stor Fordel benytte en Nutsch eller et Planfilter, en Porcellainscylinder paa $10^{cm}$ Diameter og $4^{cm}$ Højde med gjennemhullet Bund. Under denne Bund gaar Cylinderen gjennem en meget flad Kegle over i en kort Stilk, der ved en gjennemboret Kautschukprop anbringes paa Sugeflasken. Ved Filtrationen lægges først en linned Klud over Sibunden, for at støtte Papiret, dernæst et Filter, et Lag

$50^{ccm}$ Sipose-Urt af 14,4 Vol. % Blg. (Urt A) gav paa denne Maade 0,0160 Gm. Platinsalt, svarende til 0,0063 Gm. Cholin i $50^{ccm}$ (idet 100 Platinsalt = 39,34 Cholin) eller 0,126 Gm. pr. Liter.

$300^{ccm}$ af samme Urt inddampes til $^{1}/_{3}$—$^{1}/_{4}$, blandes, efter Afkøling i Is, med 60 Gm. Kalkmælk af den omtalte Styrke, hvorpaa der strax tilføjes 140 Gm. Vinaand. Efter Afdampning af Vinaanden fortyndes den filtrerede Vædske til 300 Gm., hvorpaa den fældes med $40^{ccm}$ Jodopløsning. Perjodidet vaskes med $100^{ccm}$ en Procents Jodopløsning og opløses paa Filtret i opvarmet Svovlsyrlingvand. Til Dekomposition af Jodidet bruges Chlorsølv af $40^{ccm}$ fem Procents Sølvnitratopløsning. Der vandtes 0,1080 Gm. Platinsalt, som gav 0,0343 Gm. Platin (31,8 %, beregnet 31,63 %). Hertil svarer 0,0425 Gm. Cholin i $300^{ccm}$, eller 0,142 Gm. pr. Liter.

$500^{ccm}$ af samme Urt gav ved lignende Behandling 0,178 Gm. Platinsalt, hvilket svarer til 0,140 Gm. Cholin pr. Liter.

En anden Urt af 14,6 Vol. % Blg. (Urt B) gav ved direkte Bestemmelse i $50^{ccm}$ 0,133 Gm. Cholin pr. Liter, ved Bestemmelse i $300^{ccm}$, efter Udfældning med Kalk, fandtes 0,138 Gm.

I en 3die Urt af 14,3 Vol. % Blg. (Urt C) fandtes resp. 0,108 og 0,123 Gm. pr. L.

I en Pururt af 21,4 Vol. % Blg. fandtes 0,190 og 0,210 Gm. pr. L.

---

Papirmasse og paany et Filter. Papirmassen faas let ved Indvirkning af stærk Saltsyre paa Filtrerpapir, hvorved Fibrene næsten øjeblikkelig skilles fra hinanden; den udvaskede Masse opbevares i fugtig Tilstand; til Brug opslemmes den i en Flaske med meget Vand. Ved den her omtalte Montering af Nutschen lade selv vanskeligere Bundfald sig let frafiltrere fuldstændigt, og da Filtration og Udvaskning herved ofte lader sig fuldføre paa faa Øjeblikke, er denne Filtrationsmaade i høj Grad at anbefale ved mange Arbejder. Selv ved kvantitative Forsøg kan den, som her sket, særdeles ofte anvendes, enten naar det er den gjennemløbne Vædske, der skal benyttes, eller naar Bundfaldet skal opløses igjen paa Filtret.

Opsamlingen af Platinsaltet sker bedst paa et Asbestfilter af den ved Sukkerbestemmelser med Fehlings Vædske almindelig anvendte Form. Efter Udvaskning med absolut Alkohol heldes lidt Æther paa, hvorefter der suges en Strøm af tør Luft igjennem, medens Filtret opvarmes til henved 100° ved et tyndt Blyrør, der er snoet nogle Gange derom, og som staar i Forbindelse med en lille Kolbe med Vand, der holdes i livligt Kog. Efter at Dampstrømmen er standset, lader man Filtret afkøles fuldstændigt i den tørre Luftstrøm.

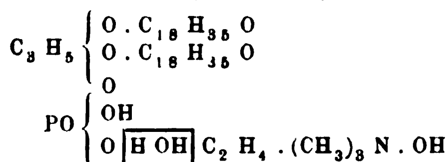
Som Middeltal heraf faas i Humleurt paa 14,4 Vol. % Blg. 0,122 Gm. Cholin pr. Liter ved den direkte Bestemmelse, 0,134 Gm. efter Fældning med Kalk, eller paa 100 000 Dele Extrakt henholdsvis 89 og 98 Cholin. Beregnes den i Pururten fundne Cholinmængde paa 100 000 Dele Extrakt, faas 88 og 98. Den ringe Mængde af Basen, der ifølge Griess og Harrow indføres ved Kogningen med Humle, er saaledes uden al Betydning i kvantitativ Henseende.

Det vil ses, at om end de direkte Bestemmelser stemme ret godt overens med dem, hvor man havde ladet en Udfældning med Kalk og Vinaand gaa forud, have disse sidste dog bestandig givet lidt højere Resultater. Langt mere fremtrædende bliver dog denne Forskjel, naar man lader den med Kalk blandede Urt henstaa i 24 Timer, førend Vinaanden tilsættes. Man finder nemlig i saa Tilfælde en Cholinmængde, der er henved dobbelt saa stor, som den foran anførte. Forøvrigt var Behandlingen ganske som ved de foregaaende Analyser, kun bør der her tilsættes en noget større Mængde Vinaand. Paa denne Maade gav 300ccm af Urt A 0,1923 Gm. Platinsalt, svarende til 0,252 Gm. Cholin pr. Liter, medens B og C gav henholdsvis 0,240 og 0,228 Gm. Cholin pr. L.

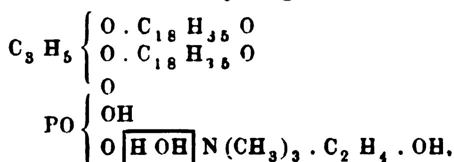
Foruden det frie Cholin indeholder Urt altsaa en næsten lige saa stor Mængde af denne Base i en Forbindelse, som spaltes ved Indvirkning af Kalkhydrat i Kulden. Om vi her have med Lecithin at gjøre, som, selv uopløseligt i rent Vand, maaske kunde holdes i Opløsning ved en af Urtens Bestanddele, eller muligvis med en Forbindelse af Glycerinfosforsyre med Cholin, idet Fedtsyrerne alt vare afspaltede, kan jeg for Øjeblikket ikke afgjøre[1]).

---

[1]) Ifølge Strecker, Hundeshagen, Gilson, (Z. f. physiol. Ch. 1888, S. 585) er Lecithin at opfatte som en ætheragtig Forbindelse af Distearin (-oleïn, -palmitin)-Glycerinfosforsyre med Cholin:



og ikke som et Salt af denne Syre og Base:



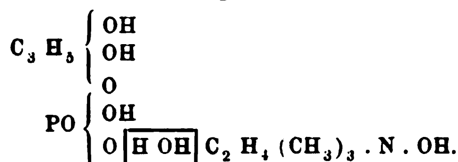
Schulze og Steiger[1]) have beregnet Mængden af Lecithin i forskjellige Frøsorter ved Bestemmelse af Fosforet i de deraf med Æther og absolut Vinaand vundne Udtræk og Multiplikation af den fundne Fosformængde med 26. Paa denne Maade fandt de i Byg en Lecithinmængde af 0,74 % (beregnet paa det tørre Korn). Til Fremstilling af 1 Liter Urt paa 14,4 Vol. % Blg. vil der omtrent medgaa 230 Gm. tørt Byg, hvori altsaa, efter Schulze, 1,70 Gm. Lecithin. I den med Kalk i 24 Timer behandlede Urt fandtes omtrent 0,25 Gm. Cholin pr. Liter, svarende til $0{,}25 \times 6{,}67 = 1{,}67$ Gm. Lecithin. Ifølge dette maa man da antage, at alt Byggets Lecithin ved Mæskningen gaar over i Opløsningen, om end idetmindste delvis i dekomponeret Tilstand, hvilket viser sig ved et Indhold i Urten af frit Cholin. At denne Spaltning af Lecithinet finder Sted under Paavirkning af et Ferment, er vel næppe usandsynligt.

Flere Analyser af Øl havde vist, at Indholdet af Cholin heri var omtrent det samme som i Urt. Det maatte herefter anses for sandsynligt, at denne Base ikke blev berørt af Gjæringen, men for at komme til Sikkerhed herover, blev der foretaget en Række Analyser paa den samme Urt før Gjæringen, efter Hovedgjæringen og efter at al Gjæring efter længere Tids Forløb var tilende. I et Pasteursk Gjæringskar af fortinnet Kobber, der rummede ca. 10 Liter, blev omtrent 7 Liter Urt af 14,4 Vol. % Blg. steriliseret. Efterat Urten ved Karrets Henstand i 14 Dage havde vist sig at være steril, blev en større Prøve deraf udtaget til

---

saaledes som Diakonow har opfattet det. For den førstnævnte Konstitution taler bl. a. Lecithinets Forhold overfor Syrer og Baser, idet det kun langsomt dekomponeres af fortyndet Svovlsyre, derimod med største Lethed af svag Natronlud.

En tilsvarende Forbindelse, hvoraf Fedtsyrerne vare eliminerede, vilde altsaa have Sammensætningen:




Hertil maa dog bemærkes, at en slig Dekomposition aldrig er bleven iagttaget ved kunstig Indvirkning paa Lecithin. Det har tvertimod herved vist sig, at Spaltningen i de 3 Komponenter, Fedtsyrer, Glycerinfosforsyre og Cholin foregik samtidigt eller maaske endog, at Cholinet afspaltedes først.

[1]) Zeitschr. für physiologische Chemie, 1889, S. 365.

Analyse. Der blev, som sædvanlig, gjort 3 Bestemmelser, en paa 50ccm Urt ved direkte Fældning med Jod, en paa 300ccm, efter Tilsætning af Kalk og øjeblikkelig Fældning med Vinaand, og en ligeledes paa 300ccm, som efter Kalktilsætningen henstod i 24 Timer, før Vinaanden føjedes til. Den heraf beregnede Cholinmængde pr. Liter vil findes anført under I a, b, c. Urten blev nu inficeret med Carlsberg Gjær Nr. I og hensat til Gjæring ved varm Stuetemperatur. 6 Døgn senere viste Sacchometret 4,03 % Blg., efter videre 2 Døgn 3,90 %. Der udtoges da atter en større Prøve, der, efter at Kulsyren var fjernet og Vædsken filtreret klar fra Gjæren, anvendtes til 3 lignende Analyser, II a, b, c. Efter yderligere 14 Dages Henstand, altsaa ialt 22 Dage efter Gjærtilsætningen, var Attenuationen saa godt som uforandret, Gjæringen maatte altsaa nu anses for fuldstændig afsluttet. Der foretoges da paany 3 Analyser i Analogi med de foregaaende; de findes anførte under III a, b, c.

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| I a. | 0,120 | Gm. | I b. | 0,140 | Gm. | I c. | 0,249 | Gm. |
| II a. | 0,128 | - | II b. | 0,150 | - | II c. | 0,260 | - |
| III a. | 0,116 | - | III b. | 0,145 | - | III c. | 0,260 | - |

Som det vil ses, har der ikke været nogen kjendelig Forskjel paa de 3 Prøver. Ølextraktet vil derfor være forholdsvis rigest paa Basen, idet det, ifølge de anførte Analyser, vil indeholde den ret anselige Mængde af 1/4 % Cholin (fri og bunden). Den samlede Mængde af denne Base, der findes i en Liter Øl, vil omtrent være den samme som i et Hønseæg.

# Nogle Iagttagelser over Cholin og dets Homologe.

Af

R. Koefoed.

---

De senere Aars Undersøgelser have godtgjort, at iblandt de i Dyre- og Planteverdenen hyppigst forekommende organiske, kvælstofholdige Forbindelser, indtager Cholinet en ret fremtrædende Plads, og som Følge deraf maa man ogsaa indrømme Sandsynligheden af, at det i fysiologisk Henseende spiller en ikke ringe Rolle, f. Ex. som Kvælstofbærer ved Stofskiftet.

Allerede heri vil en nærmere Undersøgelse af Cholinets kemiske Forhold kunne søge sin Berettigelse, og det saa meget mere, som de Iagttagelser, vi have over dette Stof, kun ere faa og lidet udtømmende; ganske vist er det slaaet fast, at Cholinet hører til en Gruppe af Forbindelser, de kvaternære Ammoniumbaser, der igjennem Opdagerens, A. W. Hofmanns glimrende Arbejder ere fuldt ud karakteriserede, men over Cholinet selv foreligger der kun faa og spredte Iagttagelser. Desuden ligger der en Opfordring til en nærmere Undersøgelse af denne Base deri, at der findes Antydninger af, at der i Naturen og sammen med Cholinet findes analoge Forbindelser — muligvis dets Homologe — som imidlertid i de kemiske Forhold vise saa stor Overensstemmelse med Cholinet selv, at man ikke, paa Grundlag af det hidtil Bekjendte, er i Stand til bestemt at udsondre og individualisere dem.

En kemisk Undersøgelse af Cholinet deler sig derfor, med ovenstaaende Forhold for Øje, ganske naturligt i to Afdelinger; dels vil der kræves Undersøgelse af Cholinets Forhold ved Indvirkning af andre Stoffer, og dels vil det være at undersøge, hvorvidt der mellem de saaledes erholdte Iagttagelser findes nogle, der særligt kunne siges at karakterisere Cholinet selv, eller om de alle, mere eller mindre, maa siges at være særegne for

den hele Gruppe af de kvaternære Ammoniumbaser, saaledes at de ikke direkte give Midlerne til at adskille Gruppens forskjellige Led.

I efterstaaende Linier meddeles nogle Forsøg, der ere foretagne med disse Maal for Øje — Forsøg, der imidlertid pludseligt have maattet afbrydes, saaledes at deres Formaal ikke er opnaaet fuldstændigt, og de have faaet en mere fragmentarisk Karakter end tilsigtet.

---

Som nævnt hører Cholinet til de kvaternære Ammoniumbaser, den Gruppe af organiske Kvælstofforbindelser, der betragtes som Substitutionsprodukter af det hypothetiske Ammoniumhydroxyd, $H_4 \overset{v}{N} . OH$, hvori alle fire, med Kvælstof forbundne Brintatomer, ere ombyttede med Alkoholradikaler; den almindelige Form for det kvaternaire Ammoniumradikal bliver altsaa, naar R betegner et monovalent Alkoholradikal, $R_4 \overset{v}{N}$—, og det ses, at der kan tænkes, og i Virkeligheden kjender man ogsaa, et overordentlig stort Antal af saadanne Forbindelser, idet der for forskjellige Alkoholradikaler opstaar forskjellige Ammoniumbaser.

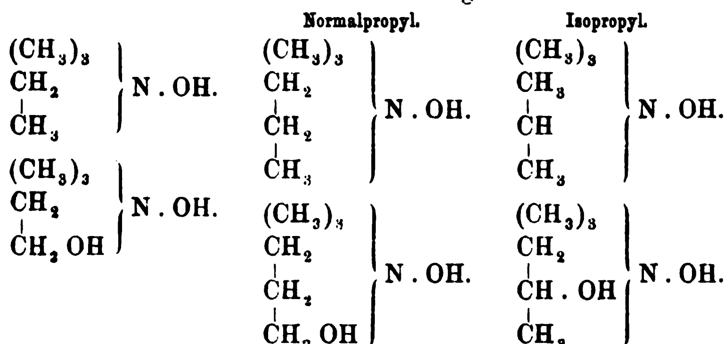
Igjennem Undersøgelser af A. Strecker[1]), O. Liebreich[2]), A. Baeyer[3]), A. Wurtz[4]), E. Harnack[5]), E. Harnack og O. Schmiedeberg[6]), af hvilke Wurtz fremstillede Cholinet synthetisk, maa det betragtes som fastslaaet, at Cholinet er at opfatte som Hydroxydet af et Ammonium, hvori 3 Brintatomer ere substituerede med 3 Methylgrupper, det fjerde Brintatom derimod med Gruppen Oxæthyl $C_2H_4 . OH$, saaledes at Cholinets Formel bliver $(CH_3)_3 (C_2H_4 . OH) \overset{v}{N} . OH$. Her maa bemærkes, at medens der tidligere herskede nogen Usikkerhed i Brugen af Benævnelsen Cholin, idet man sammenblandede Navnene Cholin og Neurin, betegner man nu med Cholin udelukkende Oxæthyltrimethylammoniumforbindelsen, medens Navnet Neurin benyttes for den af Liebreich (l. c.) fundne Base, Vinyltrimethylammoniumhydrat, $(CH_3)_3 (C_2H_3) \overset{v}{N} . OH$[7]). Naar der iblandt de talrige, analoge Forbindelser skulde udvælges nogle enkelte til

---

[1]) Liebigs Ann. 123, S. 355; 1862. [2]) Smst. 134, S. 29; 1865.
[3]) Smst. 140, S. 306; 1866; 142, S. 322; 1867.
[4]) Smst. Supplb. 6, S. 116 og 197; 1868.
[5]) Archiv f. experiment. Pathologi 4, S. 168; 1876.
[6]) Smst. 6, S. 101; 1876.
[7]) L. Brieger, Untersuch. über Ptomaine, 1885—86.

Sammenligning med Cholinet, laa det nær at vælge paa den ene Side den Base, hvoraf Cholinet er at opfatte som Oxybase, nemlig Trimethylæthylammoniumhydrat $(CH_3)_3 (C_2 H_5) \overset{v}{N} . OH$, og paa den anden Side det næste Led i samme Række, nemlig Trimethylpropylammoniumhydrat med dens Oxybase og de tilsvarende isomere Forbindelser.

Derved vilde man altsaa faa undersøgt Forbindelserne:




hvad der antagelsesvis vilde frembyde Interesse ogsaa ud over det omtalte Maal, idet en Sammenligning mellem de forskjellige Forbindelser vilde kunne vise, dels den Indflydelse, som Indførelsen af en Methylgruppe ($CH_3$—) istedetfor et Brintatom medfører, og det, hvad enten Indtrædelsen sker under Dannelse af en Normal- eller en Isoforbindelse, og dels den Indflydelse, Dannelsen af en Hydroxylgruppe istedetfor et Brintatom medfører for Forbindelsernes kemiske og fysiske Forhold, ligesom ogsaa de isomere Forbindelsers Forhold overfor Iltningsmidler synes at kunne frembyde Interesse.

Til Fremstillingen af Basernes Chlorider, af hvilke foreløbigt kun fire, nemlig: Æthyltrimethylammoniumchlorid
Oxæthyl - - -
Isopropyl - - -
Isooxypropyl - - -
kom til Anvendelse, anvendtes Trimethylamin i vandig, 33 %-holdig Opløsning fra Kahlbaum, og Fremstillingen foregik paa følgende Maade.

### I. Æthyltrimethylammoniumchlorid.

40 Gram Æthyljodid, fremstillet paa den af A.W. Hofmann[1]) angivne Maade af Æthylalkohol og Jod ved Hjælp af alm. Fosfor, og kogende ved 71,9° ved 761mm Tryk, indsmeltedes i 3 Glasrør

[1]) Liebigs Ann. 115, S. 272.

med et lille Overskud af 33 %-holdig Trimethylamin (45 Gram beregnet) og saameget absolut Alkohol, at Æthyljodidet gik i Opløsning, og ophededes $24^h$ i kogende Vand. Rørindholdet koncentreredes paa Vandbad og hensattes til Krystallisation; de udskilte Krystaller samledes paa Filter, vaskedes med absolut Alkohol og tørredes i Vakuum. Moderluden gav ved videre Inddampning en Del Krystaller, der vare svagt gule, men som ved Vaskning med Alkohol bleve hvide. Efter Tørring i Vakuum fandtes Følgende:

0,513 Gr. Jodid gav efter Kjeldahl's Methode 33,0 mgr. N.
0,227 Gr. — forbrugte 10,55 ccm $^1/_{10}$ norm. $AgNO_3$ = 0,1335 gr. J.

| Beregnet. | Fundet. |
|---|---|
| 6,54 % N | 6,43 % |
| 59,02 % J | 58,9 % |

Jodidet blev ved Opløsning i Vand og Behandling med et stort Overskud af Chlorsølv omdannet til Chlorid.

## II. Oxæthyltrimethylammoniumchlorid.

Denne Forbindelse fremstilledes dels af naturligt forekommende, cholinholdige Stoffer (Æggeblommer, Oxehjerner), dels ved Synthese. Til Fremstillingen af Cholin af Æggeblommer benyttedes den af Diakonow[1]) angivne Methode, idet Æggeblommerne bleve udtrukne med Æther og derpaa med Alkohol; de to Opløsninger bleve inddampede, og Residuet kogt med Barytvand, hvorved Cholinet frigjøres. Efter Filtrering fra de udskilte Barytsæber, fældedes Overskuddet af Baryt med Kulsyre, Vædsken filtreredes og inddampedes, hvorpaa Resten blev udtrukken med absolut Alkohol, og den saaledes erholdte Opløsning fældedes endelig med Platinchlorid, hvorefter det dannede Cholinplatinchlorid rensedes ved Omkrystallisation, Behandling med ganske fortyndet Salpetersyre (efter Schmiedeberg og Harnack, l. c.) og ny Omkrystallisation. Til Fremstilling af Chloridet sønderdeltes Platindobbeltsaltet med Svovlbrinte.

Til Fremstillingen af Cholinet af Oxehjerner fulgtes dels den samme Fremstillingsmaade, dels den af L. Brieger[2]) angivne Methode, hvorefter den rengjorte og finthakkede Hjernemasse sønderdeltes ved Kogning med stærk Saltsyre, efter Filtrering inddampedes den

[1]) Jahresbericht. d. Chemie 1867. S. 776.
[2]) Weitere Untersuchungen über Ptomaine, S. 55.

saaledes dannede Opløsning paa Vandbad under Afstumpning af Syren, Resten blev udtrukken med Alkohol, og den alkoholiske Opløsning fældedes med en alkoholisk Opløsning af Kvægsølvchlorid, hverved Cholinet udfældedes som Cholinkvægsølvchlorid, der rensedes ved Omkrystallisation og sønderdeltes med Svovlbrinte.

Ved Cholinets synthetiske Fremstilling arbejdedes som angivet af Wurtz[1]), idet Æthylenchlorhydrin (Kogepunkt 128° ved 760$^{mm}$ Tryk) ophededes i Vandbad i tilsmeltede Rør med den beregnede Mængde Trimethylamin i 33⁰/₀-holdig Opløsning. Det benyttede Chlorhydrin var fremstillet paa den af Ladenburg[2]) angivne Maade af Æthylenglykol, der var dannet som angivet af A. Zeller og G. Hüfner[3]) ved Kogning af Æthylenbromid med Vand og kulsurt Kali. Synthesen forløber meget rent, og ved Rørindholdets Henstand i Exsiccator udkrystalliserede der 2—3 Centimeter lange Naale af fuldstændig rent Cholinchlorid. Moderluden herfra gav yderligere en Del Chlorid, og den sidste Moderlud oparbejdedes paa Cholinkvægsølvchlorid ved Fældning med en mættet vandig Opløsning af Kvægsølvchlorid.

### III. Isopropyltrimethylammoniumchlorid.

Jodidet af denne Forbindelse fremstilledes paa ganske samme Maade som Æthyltrimethylammoniumjodidet, idet Isopropyljodid i tilsmeltede Rør ophededes i Vandbad med et lille Overskud af 33⁰/₀-holdig Trimethylamin under Tilsætning af saameget Alkohol, at Isopropyljodidet gik i Opløsning; en saadan Tilsætning af Alkohol fremskynder Reaktionen meget ved at bringe Bestanddelene i inderligere Berøring med hinanden, og influerer forøvrigt ikke paa Processen. Det benyttede Isopropyljodid blev fremstillet paa den af W. Markovnikoff[4]) angivne Maade, idet 200 Gram Glycerin (Vgtfd. 1,25), 300 Gram Jod og 160 Gram Vand bragtes i en Kolbe, hvorpaa der blev tilsat 55 Gram alm. Fosfor; efterat Tilsætningen var endt, og Vædsken havde staaet nogen Tid, afdestilleredes 250 Gram med Kogepunkt 80—100°, Destillatet vaskedes med kulsurt Natron og afvandedes med Chlorcalcium, hvorefter en Rektifikation gav 200 Gram Destillat af Kogepunkt 89,5—90,5°. Dette Produkt mættedes med luftformig Jodbrinte[5]), henstod til næste Dag, og der afdestilleredes nu hvad der gik over fra 85—90°. Destillatet vaskedes med kulsurt Natron, afvandedes med Chlor-

[1]) Liebigs Ann. Supplbd. 6, S. 116. [2]) Ber. d. d. ch. Ges. 16, S. 1407. [3]) Jahresbericht f. p. Chemie, 119, S. 225. [4]) Liebigs Ann. 138, S. 364. [5]) L. Meyer, Ber. d. d. ch. Ges. 20, S. 3881.

calcium og destilleredes med Thomsens Deflegmator, hvorved erholdtes 175 Gram med Kogepunkt 89,5° (756$^{mm}$ Tryk).

Indholdet af Rørene, som ved Aabning viste et ringe Overtryk, afdampedes i Vakuum ved alm. Temperatur, og den udskilte Krystalmasse tørredes; af 40 Gram Isopropyljodid og 50 Gram 33 %-holdig Trimethylamin (beregnet 13,9 Gram vandfri = 42,4 Gram 33 %-holdig) erholdtes paa denne Maade 51 Gram raat Jodid. Ved Omkrystallisation af Alkohol erholdtes smukt udviklede, regulære Krystaller (iagttagne Former ∞O∞ og O.∞O∞), der ere let opløselige i Vand og varm Alkohol, tungere opløselige i kold Alkohol, og denne Opløsning fældes af Æther. Saltet er henflydende og farves let brunt.

0,4373 gr., omkrystalliseret af Alkohol og tørret i Vakuum, gav efter Kjeldahl 26,48 mgr. N.

0,2980 gr., omkrystalliseret af Alkohol og tørret i Vakuum, forbrugte 13,05$^{ccm}$ 1/10 norm. $AgNO_3$ = 0,1651 gr. J.

| Beregnet. | | Fundet. |
|---|---|---|
| 6,13 % | N | 6,05 % |
| 55,41 % | J | 55,40 % |

Jodidet omdannedes ved Behandling med et Overskud af Chlorsølv til Chlorid.

### IV. Isooxypropyltrimethylammoniumchlorid.

Det til Synthesen af denne Forbindelse nødvendige Isopropylenchlorhydrin fremstilledes ved Mætning af almindelig (ɔ: Iso-) Propylenglykol, der fremstilledes paa den af A. Bélohoubek[1]) angivne Maade ved Destillation af Mononatriumglycerat. 2000 Gram afvandet Glycerin blandes med 875 Gram Natronhydrat og denne Blanding destilleredes i 8 Portioner i en Jernbeholder, hver Gang saalænge der gik noget over. De samlede Destillater udgjorde 1150 Gram, hvoraf Propylenglykolen udrystedes med Æther, og efter Rektifikation erholdtes 150 Gram Propylenglykol med Kogepunkt 187—89°, der mættedes i Løbet af 22 Timer med tør Chlorbrinte, saaledes som Ozer[2]) angiver. Efter Destillation, Vaskning med kulsurt Natron, Afvanding og Rektifikation, overdestillerede der 51 Gram Isopropylenchlorhydrin af Kogepunktet (i Thomsens Deflegmator) 127°. Chlorhydrinet indsmeltedes i Rør med den beregnede Mængde 33 %-holdig Trimethylamin og ophededes i kogende

[1]) Ber. d. d. ch. Ges. 12, S. 1872. [2]) Liebigs Ann. Supplbd. I, S. 254.

Vand i 18 Timer, hvorefter Rørindholdene ved Inddampning og Henstand i Exsiccator afsatte en rigelig Mængde Krystaller af Isooxypropyltrimethylammoniumchlorid.

---

Med de paa denne Maade erholdte Haloidsalte af de 4 Baser anstilledes nu Forsøg paa Dannelsen af karakteristiske Forbindelser, navnlig af Dobbeltforbindelser med Metalsalte, saaledes som det fremgaar af nedenstaaende Oversigt, der indeholder en Sammenstilling af de vigtigste Resultater, der forelaa ved Arbejdets Afbrydelse.

For at lette Sammenligningen mellem de forskjellige Basers Forhold ere Resultaterne sammenstillede saaledes, at de til hinanden svarende Forbindelser behandles under Et, eller rettere saaledes, at de forskjellige Reagensers Forhold overfor de enkelte Baser træder tydeligt frem. Som allerede nævnt, danne de kvaternære Ammoniumbaser en vel karakteriseret Gruppe, og de enkelte Led i denne forholde sig i det Hele og Store ensartet overfor visse Stoffer, som derfor betragtes som Reagenser for hele Gruppen; iblandt disse Stoffer staa i første Række Brintplatinchlorid, Brintguldchlorid, Kvægsølvchlorid, Kvægsølvjodid (opløst i Kaliumjodid) og Jod (opløst i Kaliumjodid), og i nedenstaaende Undersøgelser er der derfor først og fremmest taget Hensyn til Basernes Forhold overfor disse Reagenser, idet de derved erholdte Forbindelser ere undersøgte.

### A. Platindobbeltchlorider.

Æthyltrimethylammoniumplatinchlorid, $[(CH_3)_3(C_2H_5)N]_2 . PtCl_6 = 582{,}24$. Ved Inddampning af de sammenblandede Opløsninger af de to Chlorider udkrystalliserer Saltet i vandfri, gulrøde, regulære Krystaller[1]), der ere let opløselige i Vand, uopløselige i Vinaand og Æther.

Analysen af den foreliggende Forbindelse gav følgende Resultat:

0,4118 gr. gav ved Tørring ved 110° 0,4110 gr., som efterlod 0,1368 gr. Pt.
0,501 gr. — — — 0,500 gr., som efter Kjeldahl gav 23,75 mgr. N.

| Beregnet. | | Fundet. |
|---|---|---|
| 33,37 % | Pt | 33,29 % |
| 4,81 % | N | 4,75 % |

Kvælstofmængden i disse Forbindelser lader sig meget bekvemt bestemme efter Kjeldahls Methode, men man maa lade Stoffet

---

[1]) Topsøe, Oversigt over K. D. Vid. Selskabs Forhandlinger 1882, S. 94.

koge forholdsvis længe med Svovlsyren; i alle Forsøgene har Kogetiden varieret fra 8—12 Timer. For Platinforbindelsernes Vedkommende er Platinet, forinden Destillationen med Natron, blevet udfældet med Zink, og for de senere nævnte Kvægsølvforbindelsers Vedkommende er Kvægsølvet blevet udfældet ved Hjælp af svovlsurt Jernforilte, saaledes at Dannelsen af Metalammoniakforbindelser, der ikke lade sig dekomponere af Natron, er undgaaet.

Oxæthyltrimethylammoniumplatinchlorid, $[(CH_3)_3(C_2H_4.OH)N]_2.PtCl_6 = 614{,}16$; Cholinplatinchlorid danner en i Vand let opløselig. i Vinaand og Æther uopløselig Forbindelse, der krystalliserer dimorf, muligt endog trimorf[1]), idet Saltet ved Afkøling af en i Varmen mættet Opløsning udkrystalliserer i store, orangerøde 6-sidede Prismer, medens det ved frivillig Fordampning af en ved almindelig Temperatur mættet Opløsning faas i store, gulrøde, rhombiske Tavler. Hundeshagen[1]) har iagttaget, at af en i Varmen mættet Opløsning, der indeholder omtrent 15% Alkohol, udkrystalliserer Saltet ved Afkøling i Oktaedre, men en saadan Krystallisation er det ikke lykkedes mig at fremkalde. Cholinplatinsaltets Dimorfi har givet Anledning til, at man paa den forskjellige Krystalform har villet basere Godtgjørelsen af, at det naturligt forekommende Cholin ikke skulde være identisk med det ad synthetisk Vej fremstillede, men i Virkeligheden er der ingen Forskjel i saa Henseende, da begge Platinsaltene kunne være dimorfe. Brieger[2]) angiver, at Platinsaltet af det naturlige Cholin bliver stærkt elektrisk ved Gnidning, medens Saltet af det synthetiske Cholin skulde mangle denne Egenskab, men denne Iagttagelse er næppe rigtig; i hvert Tilfælde har jeg haft i Hænde Platinsalt af synthetisk Cholin, der ved Rivning i tør Tilstand i en Porcellainsmorter viste sig elektrisk, og paa den anden Side har jeg set Platinsalt af naturligt Cholin, der under de samme Betingelser ikke viste nogen elektrisk Polaritet.

Platinsaltet krystalliserer vandfrit, men har Tilbøjelighed til haardnakket at tilbageholde en ringe Mængde Vand, som først tabes ved 110°, hvad der utvivlsomt er Grunden til de temmelig divergerende Resultater, man tidligere kom til ved Analyse af Cholinplatinchloridet[3]).

Analysen af Cholinplatinchloridet af de forskjellige Fremstillinger gav følgende Resultat:

---

[1]) J. f. pr. Ch. 136, S. 245.
[2]) Untersuch. über Ptomaine. I. S. 37.
[3]) Brieger l. c.

1. Synthetisk fremstillet.

1ste Krystallisation, Prismer, udkrystalliserede af varm, mættet Opløsning:

0,3780 gr. gav, ved Tørring ved 110°, 0,3735 gr. Salt, som efterlod 0,1185 gr. Pt.

0,5225 gr. gav, ved Tørring ved 110°, 0,5200 gr., som efter Kjeldahl gav 23,70 mgr. N.

| Beregnet. | Fundet. |
|---|---|
| 31,63 % Pt | 31,56 % |
| 4,56 % N | 4,55 % |

2den Krystallisation. Rhombiske Tavler, udkrystalliserede af en kold, mættet Opløsning:

0,6845 gr., tørret ved 110°, efterlod 0,2165 gr. = 31,63 % Pt.

0,4450 gr. gav, ved Tørring, 0,4415 gr., som efter Kjeldahl gav 20,0 mgr. N = 4,50 % N.

2. Cholin af Æg, fremstillet efter Diakonow.

1ste Krystallisation.

0,6680 gr. gav, ved Tørring ved 110°, 0,659 gr. Salt, som efterlod 0,2088 gr. = 31,68 % Pt.

3die Krystallisation.

0,5875 gr. gav, ved Tørring, 0,5840 gr. Salt, som efterlod 0,181 gr. = 30,99 % Pt.

0,273 gr., tørret ved 110°, efterlod 0,0847 gr. = 31,00 % Pt.

0,498 gr. gav, ved Tørring, 0,495 gr. Salt, som efter Kjeldahl gav 21,8 mgr. N. = 4,40 % N.

3. Cholin af Oxehjerner.

Fremstillet efter Brieger gjennem Kvægsølvchloriddobbeltsaltet.

0,886 gr. gav 0,881 gr. ved Tørring, som efterlod 0,2790 gr. = 31,60 % Pt.

Fremstillet efter Diakonow.

1ste Krystallisation.

0,433 gr. gav 0,430 gr. ved Tørring og efterlod 0,1355 gr. = 31,51 % Pt.

2den Krystallisation, renset ved Behandling med meget svag Salpetersyre og omkrystalliseret.

0,371 gr., tørret ved 110°, efterlod 0,1155 gr. = 31,13 % Pt.

Af disse Resultater vil det ses, at medens det ad synthetisk Vej og af Oxehjerner ved Hjælp af Briegers Methode fremstillede Cholinchlorid er rent, er kun det først udkrystalliserede Produkt ved de efter Diakonow af Æg og Hjerne fremstillede Cholinplatinchlorider rent; de senere Udkrystallisationer have vel et ensartet og fuldkomment normalt Udseende, men et betydeligt lavere Platin- og Kvælstofindhold, hvorfor det ligger nær at antage, at

de indeholde Platindobbeltforbindelserne af en eller flere andre Baser, og da muligt af Cholinets højere Homologe; den ringe Mængde Materiale lægger imidlertid store Vanskeligheder i Vejen for en nærmere Undersøgelse.

Cholinplatinchloridets Forhold overfor Iltningsmidler er saa nøje undersøgt af Schmiedeberg og Harnack (l. c.), at der Intet er at tilføje; kun kan det nævnes, at foreløbige Forsøg synes at vise, at Brintoverilte egner sig til Iltning af disse Baser, og navnlig fordi Udbyttet af Iltningsprodukterne er større, end ved den af de nævnte Kemikere benyttede Salpetersyre-Methode.

Isopropyltrimethylammoniumplatinchlorid, $[(CH_3)_3 (C_3H_7)N]_2 . PtCl_6 = 610,_{18}$. Ved Sammenblanding af en stærk Opløsning af Ammoniumchloridet og en temmelig koncentreret Opløsning af Brintplatinchlorid, erholdtes en lysegul, krystallinsk Fældning, som ved Opvarmning gik i Opløsning; ved langsom Afkøling af denne Opløsning udkrystalliserede en Del temmelig lange, negformigt ordnede, kvadratiske Naale, og ved frivillig Fordampning af Moderluden erholdtes endnu en Del smukt udviklede, rødgule, kvadratiske Krystaller, meget let opløselige i varmt Vand, tungere opløselige i koldt Vand og uopløselige i Vinaand og Æther.

Analysen gav følgende Resultat:

0,3905 gr. Salt tabte intet ved Tørring ved 110° og efterlod 0,1245 gr. Pt.
0,471 gr. Salt gav efter Kjeldahl 21,3 mgr. N.

| Beregnet. | Fundet. |
|---|---|
| 31,84 % Pt | 31,88 % |
| 4,59 % N | 4,52 % |

Isooxypropyltrimethylammoniumplatinchlorid, $[(CH_3)_3 (C_3H_6OH)N]_2 . PtCl_6 = 642,_{10}$ viser i det Ydre den fuldstændigste Lighed med den tilsvarende Cholinforbindelse, men synes ikke at optræde dimorf; saavel af en varm, mættet, som af en ved almindelig Temperatur mættet Opløsning udkrystalliserer Saltet i smukke, gulligrøde, rhombiske Tavler, der ere temmelig letopløselige i Vand, men uopløselige i Vinaand og Æther.

Analysen af Saltet gav følgende Resultat:

0,6585 gr. Salt gav, ved Tørring ved 110°, 0,6570 gr. Salt, som efterlod 0,1985 gr. Pt.
0,481 gr. Salt gav, ved Tørring ved 110°, 0,480 gr. Salt, som efter Kjeldahl gav 20,6 mgr. N.

| Beregnet. | Fundet. |
|---|---|
| 30,26 % Pt. | 30,21 % |
| 4,36 % N. | 4,29 % |

For at undersøge, hvorvidt denne Homolog af Cholinet ligesom dette[1]) kan taale Inddampning med stærk Saltsyre uden at sønderdeles, afdampedes to Gram af Saltet med $5^{ccm}$ koncentreret Saltsyre; efter Inddampning til Tørhed udrørtes Saltet med absolut Alkohol og vaskedes dermed, til Filtratet var syrefrit.

0,5115 gr. Salt gav, ved Tørring ved 110°, 0,5100 gr. Salt, som efterlod 0,1547 gr. = 30,34 % Pt.

Resten af dette Salt inddampedes paany med $5^{ccm}$ koncentreret Saltsyre og behandledes som før. Ved Analysen fandtes:

0,463 gr. gav, ved Tørring, 0,461 gr. Salt, som efterlod 0,1395 gr. = 30,30 % Pt.,

saa at der ikke synes at finde nogen Sønderdeling Sted ved Saltets Behandling med Saltsyre. En saadan foregaar derimod ved Behandling med koncentreret Salpetersyre, men det lykkedes mig ikke blot tilnærmelsesvis at faa Forsøgene herover førte til en Afslutning.

**B. Gulddobbeltchlorider.**

Alle de her omtalte Dobbeltsalte have Sammensætningen $RAuCl_4$ og ere vandfri; de ere fremstillede ved Fældning af en nogenlunde stærk Opløsning af det omhandlede Chlorid med lidt mere end den beregnede Mængde 5 %-holdig Opløsning af Brintguldchlorid; de udskilte, fyldige, næsten fnuggede Bundfald, der under Mikroskopet viste sig at bestaa af meget fine Naale, bleve samlede paa Filter, udvaskede med en ringe Mængde, koldt Vand og derpaa paa Filtret opløste i kogende Vand, hvorpaa den erholdte Opløsning hensattes til langsom Krystallisation.

Æthyltrimethylammoniumguldchlorid, $RAuCl_4$ = 425,44, faas paa denne Maade som smukke, mørkt straagule, ½ Centimeter lange Naale, henhørende til det tetragonale System[2]), der ere tungt opløselige i koldt Vand og kold Alkohol, lettere opløselige i varmt Vand og varm Alkohol og uopløselige i Æther.

0,1980 gr. Salt gav, ved Tørring ved 102°, 0,1978 gr. Salt, som efterlod 0,0911 gr. Au.

0,3250 gr. Salt gav, ved Tørring ved 102°, 0,3245 gr. Salt, som efter Kjeldahl gav 10,40 mgr. N.

| Beregnet. | | Fundet. |
|---|---|---|
| 46,11 % | Au | 46,06 % |
| 3,29 % | N | 3,21 % |

[1]) Brieger, l. c. III, S. 15—16. [2]) Topsøe, l. c. S. 96.

Oxæthyltrimethylammoniumguldchlorid, RAu $Cl_4$ = 441,50, krystalliserer i monokliniske Naale, der ligesom den foregaaende Forbindelse ere straagule, men som dog ere noget lysere i Tonen. Ved længere Tids Henstand i Lyset sønderdeles det tørre Salt under Udskillelse af Guld.

0,4070 gr. Salt gav, ved Tørring ved 102°, 0,4066 gr., som efterlod 0,1806 gr. Guld.
0,387 gr., tørret ved 102°, gav efter Kjeldahl 12,10 mgr. N.

| Beregnet. | | Fundet. |
|---|---|---|
| 44,44 % | Au | 44,39 % |
| 3,17 % | N | 3,13 % |

Saltet er temmelig tungt opløseligt i Vand, dog betydelig lettere opløseligt i varmt end i koldt; for at undersøge Opløseligheden i koldt Vand, opløstes 1 Gram af Saltet i kogende Vand, og Opløsningen fortyndedes i Varmen til 25ccm, hvorefter den i Vandbad hensattes til meget langsom Afkøling til 17,5°, hvorpaa Opløsningens Vægtfylde samt Guldindholdet i ca. 10ccm bestemtes.

Ved Pyknometer fandtes Vægtfylden = 1,0071, og i 2 Forsøg fandtes:

10,0585 gr. Opløsning gav 0,0557 gr. Au ∾ 0,1254 gr. Salt opløst i 9,9331 gr. Vand,
10,0685 gr. Opløsning gav 0,0558 gr. Au ∾ 0,1256 gr. Salt opløst i 9,9429 gr. Vand,
saa at altsaa 1 Del Salt kræver 79,2 Dele Vand ved 17,5° til Opløsning,
eller 1 Mol. Salt kræver 1947 Mol. Vand ved 17,5° til Opløsning.

Ogsaa i Vinaand er Saltet opløseligt, lettere i varm end i kold Vinaand.

Isopropyltrimethylammoniumguldchlorid, RAu $Cl_4$ = 439,51, krystalliserer i meget tungtopløselige, gule Naale, hørende til det monokliniske System; de Krystaller, der faas ved langsom Afkøling af en varm Opløsning af Saltet, ere kun smaa, men fortræffeligt udviklede og vise sig i Almindelighed at være Kombinationer af Prismer, Klinopinakoid og Klinodome, undertiden forenede med Pyramide og basisk Polflade. Ligesom de foregaaende Forbindelser er ogsaa denne noget opløselig i Alkohol. Analysen gav følgende Resultat:

0,2135 gr. gav, ved Tørring ved 102°, 0,2130 gr., som efterlod 0,0949 gr. Au.
0,3345 gr. — — — 0,3340 gr., som efter Kjeldahl gav 10,53 mgr. N.

| Beregnet. | Fundet. |
|---|---|
| 44,64 % Au | 44,55 % |
| 3,19 % N | 3,15 % |

Isooxypropyltrimethylammoniumguldchlorid, $RAuCl_4$ = 455,47, har en overordentlig stor Lighed med den tilsvarende Cholinforbindelse, saavel med Hensyn til Farve som til Krystalform, men er noget lettere opløseligt i Vand, saaledes som efterfølgende Forsøg vise:

0,3740 gr. Salt gav, ved Tørring ved 102°, 0,3730 gr., der efterlod 0,1605 gr. Au.

| Beregnet. | Fundet. |
|---|---|
| 43,07 % Au | 43,03 % |

Paa lignende Maade, som ved Cholinforbindelsen, opløstes det her omtalte Salt i varmt Vand, og Opløsningen afkøledes meget langsomt til 17,5°, hvorefter ca. 5ccm afvejedes til Guldbestemmelse.

5,031 gr. Opløsning gav 0,0415 gr. Au
5,029 gr. — — 0,0410 gr. Au
} i Middeltal 0,04125 gr. Au ∾ 0,0955 gr. Salt opløst i 4,9345 gr. Vand,

saa at altsaa 1 Del Salt kræver 51,7 Dele Vand ved 17,5° til Opløsning, eller 1 Mol. Salt kræver 1310 Mol. Vand ved 17,5° til Opløsning.

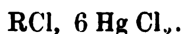
### C. Kvægsølvdobbeltchlorider.

Æthyltrimethylammoniumkvægsølvchlorid, $RCl, 6HgCl_2$ = 1746,47. Ved frivillig Fordampning af en koncentreret Opløsning, som indeholdt et stort Overskud af RCl, har Topsøe[1]) fremstillet Saltet $2RCl, HgCl_2$, medens han ved langsom Afkøling af en kogende, fortyndet Opløsning af 1 Mol. $HgCl_2$ + 2 Mol. RCl har erholdt Forbindelsen $RCl, HgCl_2$, og endelig Forbindelsen $RCl, 2HgCl_2$ ved langsom Afkøling af en varm, fortyndet Opløsning af lige Mol. af de to Enkeltsalte.

Sætter man en, selv temmelig fortyndet, Opløsning af Ammoniumchloridet til et stort Overskud af en ved almindelig Temperatur mættet (c. 7 %-holdig) Opløsning af Kvægsølvchlorid, fældes der et hvidt, fint krystallinsk, tungt Bundfald, der temmelig let lader sig opløse i varmt Vand og varm Vinaand, og som, ved langsom Afkøling af den vandige Opløsning, udkrystalliserer i ret anselige, blændende hvide Krystaller (tilsyneladende hexagonale).

[1]) l. c. S. 96—100.

Topsøe har for to andre kvaternære Ammoniumbaser fremstillet Salte, for hvilke han antager Formlen RCl, 5 Hg $Cl_2$, idet han dog samtidig gjør opmærksom paa, at Sammensætningen muligt kan være RCl, 6 Hg $Cl_2$, en Bemærkning, der navnlig gjælder Tetramethylammoniumsaltet. Topsøe baserer Afgjørelsen af, hvorvidt Dobbeltsaltet indeholder 5 eller 6 Mol. Kvægsølvchlorid paa Bestemmelsen af Kvægsølv- og Chlormængden, Bestemmelser, der imidlertid ved de foreliggende Forbindelser hverken ere saa lette at udføre eller saa paalidelige, at de med Bestemthed kunne godtgjøre den ringe Forskjel, der findes i den procentiske Sammensætning af de to Forbindelser. Den Kjeldahl'ske Kvælstofbestemmelse giver derimod, naar den udføres som omtalt ovenfor, overordentlig nøjagtige Resultater; og man er utvivlsomt ved Hjælp af den i Stand til bestemt at fastsætte Sammensætningen, som for de her omhandlede fire Forbindelsers Vedkommende viser sig at være:


RCl, 6 Hg $Cl_2$.

1,0317 gr. Salt, tørret i Vakuum, gav efter Kjeldahl 8,08 mgr. N. = 0,783 % N.

1,2150 gr. Salt, tørret i Vakuum, gav efter Kjeldahl 9,70 mgr. N. = 0,798 % N.

0,310 gr. Salt, tørret i Vakuum, opløstes i Vand og Opløsningen fældedes, efter Tilsætning af $HNO_3$, med Svovlbrinte, det udfældede Hg S vaskedes ved Dekantering, samledes paa et, ved 110° tørret, vejet Soxhletsk Asbestfilter, tørredes og vejedes. Filtratet iltedes med K Mn $O_4$ paa den af Topsøe[1]) angivne Maade, og Chlormængden bestemtes som sædvanligt. Paa denne Maade erholdtes:

0,246 gr. Hg S = 0,212 gr. Hg og 0,328 gr. Ag Cl = 0,081 gr. Cl.

| | Beregnet for | | Fundet. |
|---|---|---|---|
| | RCl . 5 Hg $Cl_2$ | RCl . 6 Hg. $Cl_2$ | |
| N | 0,95 % | 0,80 % | 0,783—0,798 % |
| Hg | 67,69 % | 68,64 % | 68,39 % |
| Cl | 26,36 % | 26,33 % | 26,13 % |

Saltet er temmelig let opløseligt i varmt Vand og varm Vinaand, tungt opløseligt i koldt Vand og næsten uopløseligt i kold Vinaand.

Oxæthyltrimethylammoniumkvægsølvchlorid, RCl, 6 Hg $Cl_2$ = 1762,43, faas ved Omkrystallisation af det fældede Salt i

[1]) Oversigt over K. D. Vid. Selskabs Forhandlinger 1881, S. 28.

hvide, smukt udviklede, hexagonale Krystaller (i tydelige, rhomboedrisk hemiedriske Former[1]).

Analysen gav følgende Resultat:

0,655 gr. fældet Salt, tørret i Vakuum, gav efter Kjeldahl 5,00 mgr. N.
1,2575 gr. omkrystalliseret Salt gav efter Kjeldahl 9,75 mgr. N.
0,455 gr. fældet Salt, tørret i Vakuum, gav, som ovenfor, 0,342 gr. Hg S = 0,2949 gr. Hg og 0,4580 gr. Ag Cl = 0,1132 gr. Cl.
0,6940 gr. omkrystalliseret Salt, tørret i Vakuum, gav 0,5475 gr. Hg S = 0,4719 gr. Hg og 0,7323 gr. Ag Cl = 0,1811 gr. Cl.

| | Beregnet for | | Fundet. |
|---|---|---|---|
| | $RCl.5\,HgCl_2$ | $RCl.6\,HgCl_2$ | |
| N | 0,94 % | 0,79 % | 0,764—0,775 % |
| Hg | 66,96 % | 68,03 % | 67,80—67,99 % |
| Cl | 26,08 % | 26,09 % | 26,02—26,10 % |

Brieger[2]) har tidligere fremstillet denne Forbindelse og har, ifølge nogle Kvægsølvbestemmelser, tillagt dem Formlen RCl, $6\,HgCl_2$; han hævder, at man ved Hjælp af denne Forbindelse kan udfælde Cholinet kvantitativt, naar Fældningen sker i vinøs Opløsning med en vinøs Opløsning af Kvægsølvchlorid. Mine Forsøg have bekræftet dette og endvidere vist, at man ogsaa af en vandig Opløsning kan fælde Cholinet kvantitativt, naar man til Fældningen benytter et Overskud af en ved almindelig Temperatur mættet (7 %-holdig) Opløsning af Kvægsølvchlorid, idet Dobbeltforbindelsen er uopløselig heri. $10^{ccm}$ af en Opløsning af Cholinchlorid, indeholdende 0,358 Gram Chlorid, fældedes med $10^{ccm}$ Kvægsølvchloridopløsning. Udbyttet var i to Forsøg henholdsvis 4,4 og 4,3 Gram af Dobbeltforbindelsen (beregnet 4,5 Gram), og Filtratet gav, efterat Kvægsølvet var fjernet med $H_2S$ og efter Inddampning til et ringe Rumfang, ingen Reaktion med Jod i Jodkalium, der — se nedenfor — er et meget fint Reagens for Cholin. Dobbeltsaltet er altsaa uopløseligt i en Kvægsølvchloridopløsning, næsten uopløseligt i kold Vinaand, tungt opløseligt i koldt Vand, lettere opløseligt i varmt Vand.

Isopropyltrimethylammoniumkvægsølvchlorid, RCl, $6\,HgCl_2$ = 1760,74, krystalliserer, ligesom de foregaaende Forbindelser, i hvide, hexagonale Krystaller, tungt opløselige i koldt Vand, lettere i varmt, noget opløselige i varm, men uopløselige i kold Vinaand.

---

1) Topsøe, l. c. 1882, S. 108. 2) l. c. II, S. 54—55.

1,3700 gr. Salt, tørret i Vakuum, gav 10,80 mgr. N.
0,710 gr. Salt — — 0,482 gr. Hg.

| | Beregnet for | | Fundet. |
|---|---|---|---|
| | $RCl.5HgCl_2$ | $RCl.6HgCl_2$ | |
| N | 0,94 % | 0,796 % | 0,788 % |
| Hg | 67,05 % | 68,09 % | 67,88 % |

Isooxypropyltrimethylammoniumkvægsølvchlorid, $RCl, 6HgCl_2$ = 1776,40, er i det Ydre ikke til at skjelne fra den tilsvarende Cholinforbindelse og krystalliserer ligesom denne i hvide, hexagonale Former, henhørende til den rhomboedriske Hemiedri. Ogsaa i Opløselighedsforholdene viser Forbindelsen den fuldkomneste Overensstemmelse med Cholinforbindelsen.

1,170 gr., tørret i Vakuum, gav efter Kjeldahl 8,55 mgr. N.
0,4580 gr., — — gav 0,3600 gr. HgS = 0,3105 gr. Hg, og Filtratet forbrugte, efter Iltning, ved Titrering med 1/10 norm. $AgNO_3$ og Rhodanammonium 32,58 ccm Sølvopløsning = 0,1136 gr. Cl.

| | Beregnet for | | Fundet. |
|---|---|---|---|
| | $RCl.5HgCl_2$ | $RCl.6HgCl_2$ | |
| N | 0,93 % | 0,79 % | 0,731 % |
| Hg | 66,34 % | 67,60 % | 67,80 % |
| Cl | 25,84 % | 25,89 % | 25,89 % |

### D. Kvægsølvdobbeltjodider.

Med en Opløsning af Kvægsølvjodid i Kaliumjodid (Meyers Reagens) give Salte af de her omtalte Baser gulhvide eller gule, krystallinske Bundfald, der under Mikroskopet vise sig at bestaa ikke af en, men af mindst to forskjellige Forbindelser. Det synes at være forbundet med stor Vanskelighed at skille disse Forbindelser fra hinanden, men den ene af Forbindelserne faas meget let i ren Tilstand paa følgende Maade. 10 Gram Kaliumjodid opløses i 150 ccm kogende Vand, og under vedvarende Kogning sættes der til denne Vædske saa meget fint pulveriseret Kvægsølvdobbeltchlorid af vedkommende Base ($RCl, 6HgCl_2$), som lader sig opløse. Tilsætningen maa ske i smaa Portioner, og naar der ikke gaar mere i Opløsning, filtreres Vædsken igjennem et varmt Filter ned i et varmt Glas og hensættes til langsom Afkøling; herved udkrystalliserer Kvægsølvdobbeltjodidet i store, veludviklede Krystaller, der samles paa et Pimpstensfilter, udvaskes med en ringe Mængde Alkohol, hvori Forbindelserne ere noget opløselige, og

tørres i en tør Luftstrøm. De saaledes fremstillede Forbindelser, der ere af forskjellig Sammensætning, idet Æthyl- og Isopropyltrimethylammoniumforbindelserne have Sammensætningen R J, Hg $J_2$, medens de tilsvarende Oxybasers Forbindelser have Sammensætningen R J, 2 Hg $J_2$, sønderdeles af Vand, der opløser en Del af Saltene og efterlader en rødgul Rest, men Sønderdelingsprodukterne har jeg ikke haft Lejlighed til nærmere at undersøge.

Æthyltrimethylammoniumkvægsølvjodid, R J, Hg $J_2$ = 667,28, udkrystalliserer i lange, silkeglinsende, meget svagt gullige, næsten farveløse, afgjort tetragonale Krystaller, der lade sig omkrystallisere af Vinaand og af en Jodkaliumopløsning, men som sønderdeles af Vand. Forbindelsen kan, foruden paa den ovenfor omtalte Maade, fremstilles ved Opløsning af lige Molekyler Ammoniumjodid og Kvægsølvjodid i kogende Vinaand; den sidst anførte Kvælstofbestemmelse er udført med et Salt af denne Fremstillingsmaade.

0,5941 gr. Salt gav, ved Tørring i Vakuum, 0,5931 gr., som efter Kjeldahl gav 11,95 mgr. N = 2,03 % N.

0,2682 gr. tørret Salt udrørtes med Vand, til Opløsningen sattes $20^{ccm}$ 10 %-holdig Kalihydrat, og i denne Vædske ledede Svovlbrinte, indtil Alt var opløst. Vædsken syredes derpaa med Svovlsyre, det fældede Svovlkvægsølv frafiltreredes, udvaskedes, opløstes ved Hjælp af Saltsyre og chlorsurt Kali, og Kvægsølvet fældedes paany som Svovlkvægsølv, der samledes paa Asbestfilter. Der fandtes:

0,0930 gr. Hg S = 0,0806 gr. Hg.
0,4703 gr. Salt, tørret i Vakuum, gav efter Kjeldahl 9,70 mgr. N.

| | Beregnet for R J . Hg $J_2$. | Fundet. |
|---|---|---|
| N......... | 2,09 % ......... | 2,03—2,06 % |
| Hg........ | 29,94 % ......... | 30,05 % |

Oxæthyltrimethylammoniumkvægsølvjodid, R J, 2Hg $J_2$ = 1136,12. Ved den ovenfor omtalte Fremstillingsmaade udkrystalliserer Forbindelsen i smukt udviklede, stærkt gule, monokliniske Krystaller, der i tør Tilstand smelte ved 131° (fundet 130,8; 131,0 og 131,8°), men som, ved Forsøg paa Omkrystallisering af en Jodkaliumopløsning, smelte sammen til en Klump i Vædsken, altsaa ved en langt lavere Temperatur (fundet 85 – 85,5°). Saltet er ingenlunde let opløseligt hverken i Jodkaliumopløsning eller i Vinaand, men lader sig dog omkrystallisere af disse Vædsker; af Vand sønderdeles det.

0,7350 gr., tørret i Vakuum, gav efter Kjeldahl (ved to Timers Kogning med $H_2 SO_4$) 8,10 mgr. N.

0,4780 gr., tørret i Vakuum, gav efter Kjeldahl (ved 12 Timers Kogning med $H_2 SO_4$) 5,80 mgr. N.

0,2405 gr., tørret i Vakuum, gav, som ovenfor, 0,0980 gr. Hg S = 0,0845 gr. Hg og[1]) 0,2457 gr. Ag J = 0,1327 gr. J.

| | Beregnet for Chol. J . 2 Hg $J_2$. | Fundet. |
|---|---|---|
| N | 1,23 % | (1,11)—1,21 % |
| Hg | 35,17 % | 35,13 % |
| J | 55,69 % | 55,18 % |

Ved Forsøg paa at vinde Forbindelsen ved Afkøling af en varm Opløsning af 1 Mol. Cholinchlorid og 2 Mol. Kvægsølvjodid i Alkohol, udkrystalliserede lange, farveløse Naale (tilsyneladende de samme, der ses indblandede i den gule Forbindelse, som faas ved Fældning af Cholinchlorid med Kvægsølvjodid, opløst i Kaliumjodid), som smelte ved 75° (fundet 74,5° og 75,0°), og som synes at have Sammensætningen Chol. Cl, Hg $J_2$.

0,6365 gr., tørret i Vakuum, gav 14,45 mgr. N.

0,2420 gr., tørret, gav, som ovenfor, 0,0806 gr. Hg (0,0935 gr. Hg S).

0,3455 gr., — — — 0,1330 gr. Hg S = 0,1146 gr. Hg.

0,3642 gr. Ag Cl + Ag J = 105,4 %.

| | Beregnet for Chol. J, Hg $J_2$ | Beregnet for Chol. Cl, Hg $J_2$ | Fundet. |
|---|---|---|---|
| | 683,24 | 592,07 | |
| N | 2,05 | 2,36 | 2,27 % |
| Hg | 29,24 | 33,75 | 33,30—33,19 % |
| Ag J | 102,80 | — | — |
| Ag Cl + Ag J | — | 105,27 | 105,4 |

Isopropyltrimethylammoniumkvægsølvjodid, R J, Hg $J_2$ = 681,25, fremstilles paa den ovenfor angivne Maade som svagt gullige, sandsynligvis tetragonale Naale, opløselige i Alkohol og Kaliumjodidopløsning.

0,5080 gr. Salt, tørret i Vakuum, gav efter Kjeldahl 10,40 mgr. N.

| Beregnet. | Fundet. |
|---|---|
| 2,057 % N | 2,05 % |

Et Forsøg paa, ved Sammenblanding af varme Opløsninger af lige Molekyler af Ammoniumjodidet og Kvægsølvjodidet i Alkohol,

[1]) Efter Topsøe, l. c.

at fremstille Forbindelsen, gav det Resultat, at der fældedes et hvidt, krystallinsk Bundfald, som kun meget vanskeligt lod sig opløse i Alkohol. Bundfaldet fremtraadte i hvide, kvadratiske Krystaller, hvis Kvælstofindhold passer med Sammensætningen 2 R J, Hg $J_2$ = 909,62.

0,5125 gr. Salt, tørret i Vakuum, gav 15,50 mgr. N.

| Beregnet. | Fundet. |
| --- | --- |
| 3,08 % N | 3,03 % |

Isooxypropyltrimethylammoniumkvægsølvjodid, R J, 2 Hg $J_2$ = 1150,09, fremtraadte ved den ovenfor omtalte Fremstillingsmaade som pragtfuldt gule, smukt udviklede, monokliniske Krystaller af en Længde af indtil 1 Centimeter. Krystalformen er, ligesom ved den tilsvarende Cholinforbindelse, fuldstændigt Feldspathens, og de hyppigst forekommende Former ere Prisme, Pinakoid, basisk Polflade og Dome. Smeltepunktet er 102°.

0,4235 gr., tørret i Vakuum, gav efter Kjeldahl 5,10 mgr. N.

| Beregnet. | Fundet. |
| --- | --- |
| 1,218 % N | 1,208 % |

### E. Polyjodider.

Det er en bekjendt Sag, at en stor Del organiske Kvælstofbaser have Evne til at binde Jod under Dannelse af Polyjodider, og denne Egenskab træffe vi ogsaa hos de her omtalte Baser. For Æthyltrimethylammoniumbasens Vedkommende har Müller[1]) fremstillet Forbindelserne R $J_3$ og R $J_5$ ved Opløsning af de beregnede Mængder Jodid og Jod i Alkohol, og angiver Smeltepunkterne henholdsvis til 64° og 68°, medens Geuther[2]) for Pentajodidets Vedkommende finder Smeltepunktet 26°; Geuther har endvidere fremstillet Forbindelsen R $J_9$ Enneajodidet, der danner grønne Krystaller af Smeltepunkt 38°.

Sætter man et stort Overskud af en stærk Opløsning af Jod i Kaliumjodid til en Opløsning af Cholinchlorid, fældes Oxæthyltrimethylammonium-Enneajodid, RJ.$J_8$ = 1242,68, som et grønt, metalglinsende, krystallinsk Bundfald, der smelter ved 49° (fundet 48,5°—49—49,5°), og som er let opløseligt i kold og varm Vinaand, tungere opløseligt i Chloroform og Æther; forsøger man paa at opløse Forbindelsen i Æther, bliver den først flydende (rimeligvis

[1]) Liebigs Ann. 108, S. 1. [2]) Smst. 104, S. 66.

under Dannelse af det nedenfor omtalte Polyjodid), og denne flydende Forbindelse opløses mere vanskeligt. Ved Henliggen i Luften afgiver Forbindelsen Jod. Den frisk fældede Forbindelse filtreredes paa Asbestfilter, vaskedes med koldt Vand og pressedes mellem Filtrerpapir til Tørhed.

0,362 gr. opløstes i Alkohol, fortyndedes med Vand, under Tilsætning af et Par Kaliumjodidkrystaller, og titreredes med Natriumhyposulfit. Der brugtes 32,7 ccm Hyposulfit ∾ 0,2956 gr. Jod. Vædsken inddampedes og gav efter Kjeldahl 4,15 mgr. N.

0,371 gr. af en anden Fremstilling brugte paa samme Maade 33,4 ccm Hyposulfit ∾ 0,3091 gr. Jod, og gav 3,90 mgr. N.

| | Beregnet. | Fundet. |
|---|---|---|
| N........ | 1,18 ......... | 1,16—1,05 |
| J........ | 10,18 ......... | — |
| $J_8$....... | 81,46 ......... | 81,66—81,88. |

Fælder man Cholinchloridopløsningen med en mindre Mængde Jod, dannes et sortebrunt, tjæreagtigt Bundfald af et lavere Jodid, der ved Tilsætning af mere Jod omdannes til Enneajodid. Det lavere Polyjodid, der er flydende ved almindelig Temperatur, idet Smeltepunktet ligger ved ca. 8°, er meget vanskeligt at fremstille i ren Tilstand, og de udførte Analyser stemme ikke godt, men Sammensætningen synes at være Pentajodidets $RJ.J_4$, idet Analysen gav Forholdet mellem Kvælstof og frit Jod = 1 : 4,7, og Forholdet mellem bundet Jod og frit Jod = 1 : 4,6, saa at Forbindelsen indeholder et Overskud af Jod.

En Opløsning af Isopropyltrimethylammoniumjodid giver med Jod i Jodkalium en grøn, metalglinsende Fældning, der har den største Lighed med Æthylbasens Enneajodid, medens Isooxypropyltrimethylammoniumjodidet giver en mørk, flydende Forbindelse, som ikke synes at blive fast med mere Jod. En nærmere Undersøgelse af disse Forbindelser har jeg ikke havt Lejlighed til at foretage.

---

En alkoholisk Opløsning af Cholinchlorid giver Bundfald med en alkoholisk Opløsning af forskjellige Metalsalte. Saaledes faas ved Afkøling af varmt blandede Opløsninger af Cholinchlorid og Cadmiumchlorid et Dobbeltsalt, Cholincadmiumchlorid, RCl, Cd $Cl_2$, krystalliserende i hvide, monokliniske Naale, der ere let opløselige i Vand, tungt opløselige i Alkohol og næsten uopløselige i Æther.

0,2855 gr. gav efter Kjeldahl 10,15 mgr. N.
0,2850 gr. gav, ved Inddampning med Svovlsyre, 0,1510 gr. $Cd\,SO_4$.
0,2280 gr. forbrugte 21,15 ccm $\frac{1}{10}$ norm. $Ag\,NO_3$ ∾ 0,0750 gr. Cl.

| Beregnet. | | Fundet. |
|---|---|---|
| 4,35 % | N | 4,31 % |
| 34,68 % | Cd | 34,50 % |
| 33,03 % | Cl | 32,89 % |

Med Zinkchlorid dannes et fnugget, i Overskud af Fældningsmidlet opløseligt Bundfald, der efter Omkrystallisation af absolut Alkohol faas i smaa, farveløse, kvadratiske Naale, som ere meget hygroskopiske, og som have Sammensætningen $2\,RCl,\ Zn\,Cl_2$.

0,209 gr. gav efter Kjeldahl 14,15 mgr. N.
0,4505 gr. fældedes med $Na_2\,CO_3$ o. s. v. og gav 0,0884 gr. $Zn\,O$ = 0,0709 gr. Zn.
0,209 gr. forbrugte 20,05 ccm $\frac{1}{10}$ norm. $Ag\,NO_3$ ∾ 0,0711 gr. Cl.

| Beregnet. | | Fundet. |
|---|---|---|
| 6,76 % | N | 6,77 % |
| 15,69 % | Zn | 15,54 % |
| 34,12 % | Cl | 34,03 % |

Cholinbromid, fremstillet ved Behandling af en Opløsning af Chloridet med fældet Sølvilte og Neutralisation af Basen med en vandig, fortyndet Brombrinteopløsning, krystalliserer i smaa, utydelige, hygroskopiske Naale, der ere meget letopløselige i Vand og i varm Vinaand, tungere opløselige i kold Vinaand og uopløselige i Æther.

0,270 gr. Bromid, tørret i Vakuum over Svovlsyre, gav efter Kjeldahl 20,50 mgr. N.

| Beregnet. | | Fundet. |
|---|---|---|
| 7,63 % | N | 7,59 % |

Ved Tilsætning af en koncentreret Opløsning af Brintplatinbromid til en ligeledes koncentreret Opløsning af Cholinbromidet fældedes et pragtfuldt, ponceaurødt, krystallinsk Bundfald, der ved langsom Afkøling af en varm, vandig Opløsning udkrystalliserer i lange, kvadratiske (?) Naale, som ere uopløselige i Alkohol og Æther.

Cholinplatinbromidets Sammensætning er $R_2\,Pt\,Br_6$ = 880,50.

0,379 gr. Salt, tørret i Vakuum, gav 0,0885 gr. Pt.

| Beregnet. | Fundet. |
| --- | --- |
| 22,07 % Pt | 22,05 % |

Med en Opløsning af Brintguldbromid giver en Opløsning af Cholinbromid et rødt, krystallinsk Bundfald, Cholinguldbromid, R Au $Br_4$ = 619,06, der ved Omkrystallisation af Vand faas i røde, hexagonale Krystaller, som ere opløselige i Vand — Opløsningen afgiver Bromdampe ved Kogning — og i Vinaand, men uopløselige i Æther.

0,428 gr. Salt, tørret i Vakuum, gav 0,1355 gr. Au.
0,521 gr. Salt, tørret, gav efter Kjeldahl 11,90 mgr. N.

| Beregnet. | Fundet. |
| --- | --- |
| 31,69 % Au | 31,66 % |
| 2,26 % N | 2,23 % |

# Nogle Bemærkninger angaaende Brugen af Kvægsølvilte til Elementaranalyse.

Af

J. Kjeldahl.

I 1876 offentliggjorte A. Mitscherlich [1]) en Methode til direkte Iltbestemmelse i organiske Stoffer ved Iltning med Kvægsølvilte i et Kvælstof-fyldt Rør og Vejning af det reducerede Kvægsølv, der blev overdestilleret ved en mellem Kvægsølvets Kogepunkt og Kvægsølviltets Dekompositionstemperatur liggende Varmegrad. Ihvorvel denne blandt alle Methoder til direkte Iltbestemmelse vistnok er den principielt rigtigste, er den dog næppe traadt meget ud i Praksis, hvortil den delikate Udførelse og forskjellige andre Omstændigheder, der nedenfor skulle omtales, vel have bidraget. Imidlertid er det dog paafaldende, at man ikke har benyttet Kvægsølvilte til Elementaranalyse efter det sædvanlige Skema, i Betragtning af den særdeles behagelige Egenskab hos dette Stof, at fremkalde en fuldstændig Forbrænding ved meget lav Temperatur. Da jeg oftere har benyttet mig af Kvægsølvilte til organisk Elementaranalyse, skal jeg i det Følgende give en kort Meddelelse om min Fremgangsmaade og mine Resultater, idet jeg dog stærkt maa fremhæve, at der heri ingenlunde indeholdes noget principielt Nyt.

Hvad først angaar Tilberedningen af Kvægsølviltet, der anvendes i Korn af Størrelse fra et Valmuefrø til en Ært eller Bønne, da fremstiller man paa sædvanlig Maade det pulverformige,

[1]) Zeitschr. f. anal. Ch. 15, S. 371.

røde Ilte; ved dernæst at befugte dette med rygende[1]) Salpetersyre og opvarme paa Sandbad, til Fugtigheden er uddreven, faas en temmelig fast Kage, der deles i Stykker af passende Størrelse. Den fuldstændige Afdrivning af Salpetersyren sker derefter ved jævn Opvarmning i et Glasrør, hvorigjennem en langsom Luftstrøm føres; man kan hertil hensigtsmæssig anvende det nedenfor omtalte Luftbad med U-Rør[2]). Det for Kvælstofilter befriede HgO slaas derefter gjennem et Sold med Masker paa ca. $1^{mm}$. En Del af Iltet vil altid være henfalden til Pulver, ligesom det er umuligt at faa Kornene af synderlig Fasthed. Det ikke ringe Besvær, hvormed det altid er forbundet at gjenvinde Kvægsølvet som Ilte i en passende Form, og den ringe Sammenhængskraft hos dette, er unægteligt en af de største Ulemper ved Benyttelsen af dette Iltningsmiddel, og gjør det i denne Henseende Kobberiltet væsentlig underlegent, medens Kvægsølviltet har Fortrinet ved den hurtige Virkning, ved dets næsten fuldstændige Mangel paa hygroskopisk Evne[3]) og ved den lave Temperatur, hvorved det tilsteder at foretage Arbejdet.

Hvad der navnlig maatte tale imod Kvægsølviltets Anvendelse i Elementaranalysen var, at Kvægsølv i ikke ringe Grad er flygtigt ved 100°, og da navnlig sammen med Vanddampe. Det viste sig da ogsaa ved de første Analyser, jeg foretog, at Brintbestemmelserne faldt ikke lidt for højt ud, og at der samlede sig en kjendelig Mængde Kvægsølv i Chlorcalciumsrørets bageste Del. Delvis undgaas denne Fejl ved Anbringelse af Tinspaaner (eller Sølvsvamp) i Forbrændingsrørets forreste Del, idet Kvægsølvet som Amalgam synes at være mindre flygtigt. Direkte Forsøg over Kvægsølvets Vægttab i et Tørrerør, ved 100—110° i Luftstrøm, viste ogsaa, at dette Tab reduceredes betydeligt ved Anbringelse af en Prop af Tinspaaner i Rørets forreste Del. Paa en langt hensigtsmæssigere og fuldkomnere Maade undgaas imidlertid denne Ulempe ved at udpumpe Luften af Forbrændingsrøret efter endt Forbrænding, og derved drive Vandet over i Absorptionsapparatet ved almindelig, eller lidt forhøjet Temperatur. Efter Hertz[4]) er Kvægsølvdamps Tension ved 20°, 40° og 100°: 0,0013, 0,0064 og $0{,}287^{mm}$, medens

---

[1]) Jvfr. Mitscherlich l. c. S. 378, Anm.

[2]) Denne Afhdl. S. 118.

[3]) 15 gm. Kvægsølvilte tiltog, ved Henliggen i fugtig Luft i $24^h$, kun 0,7 mgm, medens Kobberilte under de samme Omstændigheder var tiltaget med 13 mgm.

[4]) Landolt & Börnstein: Tabelle, 27.

de tilsvarende Tensioner af Vanddamp, efter Broch[1]), ere 17,363, 54,865 og 760$^{mm}$. Forholdet mellem Kvægsølvdampenes og Vanddampenes Tensioner ved de tre Temperaturer bliver derefter:

$$\frac{1}{13356}, \frac{1}{8573} \text{ og } \frac{1}{2649}.$$

Dette Forhold er altsaa ved 20° og 40° henholdsvis kun 0,2 og 0,3 af det ved 100°. Medens Kvægsølvet altsaa ved 100° er flygtigt med Vanddampe i en temmelig fremtrædende Grad, vil dette saa godt som slet ikke være Tilfældet i Vakuum ved lave Temperaturer.

Den almindelige Forbrændingsovn (Glasers f. Ex.) lader sig naturligvis ogsaa anvende her uden Forandring, om end en særlig for Forbrændinger med Kvægsølvilte bestemt Ovn nok lod sig konstruere en Del simplere, end de nu brugelige. Forøvrigt er Ordningen af Apparatet ganske den samme, som ellers ved Forbrændinger i Luft(Ilt)strøm. Ved en Dobbelthane staa Luft- og Ilt-Gasometrene i Forbindelse med de sædvanlige Vaske- og Tørreapparater. Derefter følger en lille Kvægsølvventil[2]), hvorpaa der lagdes særlig Vægt, da Kulsyre og Vanddamp ved livlig Udvikling ellers ufejlbarlig delvis slaa tilbage og optages af Vaske- og Tørreapparaterne. I det til en Spids udtrukne Tilledningsrør, der dypper ned i Kvægsølvdraaben, iagttog jeg saaledes ret ofte Kvægsølvet at stige tilvejrs, uden at dette havde Indflydelse paa Analysens Nøjagtighed, medens man uden Kvægsølvventil under slige Trykforhold ikke havde kunnet undgaa Tab. Endelig maa der endnu mellem Kvægsølvventilen og Forbrændingsrøret anbringes en Glashane, for at kunne lukke for Røret under Udpumpningen. Selve Forbrændingsrøret er temmelig langt, 90—100$^{cm}$, og fortil udtrukket i en Spids. De forreste 10—20$^{cm}$ rage udenfor Ovnen og omgives af et simpelt Luftbad: En Blikcylinder paa 10—20$^{cm}$ Længde og 5$^{cm}$ Gjennemsnit, hvori en anden $2^1/_2$$^{cm}$ vid, i begge Ender aaben Blikcylinder er anbragt excentrisk (for at Luftbadet kan være i stadig Ligevægt, naar det hænger paa Forbrændingsrøret) og fastloddet til dens Bunde.

I denne tomme Del af Forbrændingsrøret anbringes en Spiral af Jerntraad, derefter en Asbestprop og derpaa det ca. 50$^{cm}$ lange Lag af kornet Kvægsølvtveilte. Uden den omtalte Jerntraadsspiral vil Asbestproppen og Kvægsølviltet let forskydes, naar Luften udpumpes. Det sidste Stykke paa 20—30$^{cm}$ af Røret er tomt og

---

[1]) Landolt & Börnstein: Tabelle. 18.

[2]) Fresen. qtt. Anal. VI Aufl., S. 34.

tjener til Optagelse af Porcellainsbaaden med Analysen. En Platinbaad, som jeg forøvrigt har brugt ved de fleste Analyser, bliver temmelig stærkt angrebet af Kvægsølvet.

Den forreste Del af Røret forbindes paa sædvanlig Maade med de vejede Absorptionsapparater og Aspiratoren, og maa ligeledes let, helst ved en Tregangshane, kunne sættes i Forbindelse med en Ledning fra Vandluftpumpen. At man ved indskudte Chlorcalciumsrør maa sikkre sig mod Diffusion af Vanddamp saavel fra Aspiratoren, som fra Ledningen til Pumpen, behøver næppe at anføres. Hver Gang Røret efter nogen Henstand tages i Brug paany, pumpes det først tomt under Opvarmning.

Noget forinden en Analyse skal foretages, tændes Lamperne under Kvægsølviltet, dog kun med meget svage Blus, saa at Røret opvarmes til ca. 400° (Kvægsølviltet sortebrunt). Efterat Baaden med Stoffet er skudt ind, anbringer man bagved denne en ret stram Prop af frisk glødet Asbest, for at modvirke Sublimation bagud, en Foranstaltning, der navnlig ved Analyse af flygtige Stoffer gjør megen Nytte. Flygtige Stoffer brændes i Luft, kun tilsidst gives Ilt i nogle Minutter, for at bortbrænde Rester af Kul. Ikke flygtige Substanser brændes hele Tiden i Ilt. Forbrændingen kan udføres paa meget kort Tid, $^1/_4$—$^3/_4$ Time; Kvægsølviltet synes, som alt nævnt, at være Kobberiltet betydelig overlegent med Hensyn til hurtig Virkning, hvilket vel tildels maa tilskrives dets meget porøse Beskaffenhed, dels, og navnlig, den løsere Binding af Ilten. Som et paafaldende Exempel paa denne hurtige Virkning kan jeg anføre en Forbrænding af Thymol, der ved en Fejl foregik næsten explosionsvis paa faa Sekunder, og hvorved der dog blev fundet over 98 % af den beregnede Kulstofmængde.

Efter endt Forbrænding fjernes Kaliapparatet, hvorpaa Chlorcalciumsrøret forbindes med Pumpen, Glashanen bag Forbrændingsrøret lukkes, og Pumpen, der maa kunne tilvejebringe en Fortynding paa $30^{mm}$, sættes i Gang, medens samtidig Luftbadet ved en ganske lille Flamme opvarmes til ca. 30°. Herved gaar Vandet meget let over i Chlorcalciumsrøret, hvorpaa Forbindelsen med Pumpen aflukkes og Luften paany lades langsomt ind gjennem den bageste Glashane. Paa denne Maade falde Brintbestemmelserne meget nøjagtige ud, og den ringe Mængde Kvægsølv, der alligevel efterhaanden viser sig i Chlorcalciumsrøret, er uden kvantitativ Betydning.

Efter hvert Forsøg vil der være svundet en Del af Kvægsølviltesøjlens bageste Parti, et større Stykke ved flygtige Stoffer, der især forbrænde paa Bekostning af den bundne Ilt, et mindre ved

de ikke flygtige, hvor den frie Ilt besørger største Parten af Forbrændingen. Ved at løfte Røret op i lodret Stilling, samler man Kvægsølviltet igjen, medens det reducerede Kvægsølv tømmes ud gjennem Rørets Spids og nyt Ilte fyldes i, saa at Søjlen faar den tidligere Længde. Naar man begynder med en Iltesøjle paa 50$^{cm}$, kan man dog uden Fare lade den svinde ind til 40$^{cm}$, før man bringer nyt HgO til. Ved den svage Opvarmning, der her benyttes, er Rørets Varighed saa at sige ubegrændset.

Nedenfor gives nogle Analyse-Bilag, hvor de fundne Mængder af Kulsyre og Vand ere opførte ved Siden af dem, som beregnes efter Formlerne. Ved de under I opførte Analyser er der anvendt en Søjle af Tinspaaner paa 12$^{cm}$ Længde i Rørets forreste Del; ved Analyserne under II derimod Evakuering af Røret.

I.

| | | $CO^2$, | | $H^2O$, | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | fundet. | beregnet. | fundet. | beregnet. |
| 0,4864 gr. | Rørsukker .... | 0,6705 gr. | 0,6737 gr. | 0,2508 gr. | 0,2521 gr. |
| 0,3960 » | do. .... | 0,6047 » | 0,6015 » | 0,2388 » | 0,2288 » |
| 0,3334 » | Druesukker ... | 0,4870 » | 0,4890 » | 0,2043 » | 0,2000 » |
| 0,4469 » | Mannit ....... | 0,6457 » | 0,6482 » | 0,3127 » | 0,3092 » |
| 0,4225 » | Benzoesyre ... | 1,0717 » | 1,0743 » | 0,1921 » | 0,1870 » |
| 0,4165 » | Salicylsyre.... | 0,9280 » | 0,9296 » | 0,1689 » | 0,1657 » |
| 0,2543 » | Thymol ...... | 0,7472 » | 0,7459 » | 0,2185 » | 0,2136 » |

II.

| | | $CO^2$, | | $H^2O$, | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | fundet. | beregnet. | fundet. | beregnet. |
| 0,3560 gr. | Rørsukker .... | 0,5475 gr. | 0,5497 gr. | 0,2050 gr. | 0,2057 gr. |
| 0,3594 » | do. .... | 0,5545 » | 0,5550 » | 0,2045 » | 0,2076 » |
| 0,4049 » | Mannit ....... | 0,5903 » | 0,5939 » | 0,2820 » | 0,2832 » |
| 0,3112 » | Benzoesyre ... | 0,7883 » | 0,7857 » | 0,1398 » | 0,1378 » |
| 0,2730 » | Salicylsyre.... | 0,6080 » | 0,6098 » | 0,1050 » | 0,1069 » |

Ved kvælstofholdige Stoffer er Methoden mindre indiceret, da man jo i saa Fald alligevel maa anvende høje Temperaturer, naar der bruges Kobber eller Sølv til Destruktion af Kvælstofilterne. Anvendelse af Blyoverilte til Absorption af disse har jeg ikke fundet hensigtssvarende; noget bedre Tjeneste synes Perkins Middel at yde: en glødet Blanding af fældet Manganoverilte med Kaliumchromat + lidt Dichromat, som under Arbejdet holdes paa

en Temperatur af 200—250°. Som Exempler paa Analyser med Perkins Middel anføres følgende:

| | $CO^2$, fundet. | $CO^2$, beregnet. | $H^2O$, fundet. | $H^2O$, beregnet. |
|---|---|---|---|---|
| 0,2598 gr. Asparagin..... | 0,351 gr. | 0,346 gr. | 0,147 gr. | 0,142 gr. |
| 0,3105 » Caffëin....... | 0,571 » | 0,563 » | 0,152 » | 0,144 » |
| 0,2120 » Strychnin..... | 0,605 » | 0,600 » | 0,129 » | 0,125 » |

---

Den af Brunner[1]) allerede for henved 40 Aar siden foreslaaede Methode til Kulstofbestemmelse i organiske Stoffer ved Iltning med Kaliumdichromat og Svovlsyre, har i den af Ullgren[2]) angivne Modifikation (Anvendelse af Chromsyre istedetfor Dichromat og et særegent af Forf. konstrueret Apparat) fundet betydelig Udbredelse til Kulstofbestemmelse i Jern. Saaledes anbefalede Classen[3]) og Klein[4]) Methoden til dette Øjemed med Anvendelse af det af Classen til Kulsyrebestemmelse angivne Apparat. Ligesaa anbefaledes den af Wolff i hans »Anleitung zur chem. Untersuchung landwirthschaftl. wichtige Stoffe« til Humusbestemmelser i Agerjord. I denne Retning blev Methoden forsøgt af flere Analytikere i Rothamsted Laboratorium og af Warrington og Peake foreligger der[5]) en sammenlignende Undersøgelse over Anvendelsen af denne Fremgangsmaade og den almindelige Forbrændingsmethode paa det omtalte Materiale. Denne Sammenligning faldt ikke heldigt ud for Chromsyremethoden, idet de herved fundne Kulstofmængder i Gjennemsnit faldt ca. 20 % lavere ud, end ved Forbrænding.

I den nyeste Tid har Cross og Bevan[6]), der anvendte Methoden til Kulstofbestemmelse i Cellulose, paavist, at Tabet skyldtes Dannelsen af Kulilte, og at man derfor kom til det rette Resultat ved at maale de udviklede Gasarter, istedetfor at holde sig til Vægtforøgelsen af et Kaliapparat. Senere have de samme Forfattere givet nærmere Meddelelser[7]) om den almene Anvendelse af den

---

[1]) Jahresber. v. Liebig u. Kopp, 1875, S. 773.
[2]) Zeitschr. f. anal. Ch. 2, S. 430.
[3]) Smst. 15, S. 288.
[4]) Smst. 18, S. 76.
[5]) Journ. of the Chem. Soc. Sptbr. 1880.
[6]) Zeitschr. f. anal. Ch. 26, S. 91, efter Chem. News, 50, S. 217.
[7]) Smst. 29, S. 80, efter Journ. of the Chem. Soc. 53, S. 889.

saaledes modificerede Methode og navnlig fremhævet, at der ved den lave Temperatur, hvorved de udføre Iltningen (ca. 70°), ikke fremkommer nogen Fejl ved Udvikling af fri Ilt, da denne først optræder i kjendelig Mængde ved Temperaturer over 100°. Forff. anvende koncentreret Svovlsyre, medens Brunner og hans Efterfølgere havde blandet denne med en efter Omstændighederne større eller mindre Mængde Vand. J. Messinger[1]) har navnlig draget denne Methode stærkt frem, idet han med Anvendelse af de alt foran nævnte Fremgangsmaader (Dichromat eller Chromsyre, koncentreret Svovlsyre og Classens Apparat) har analyseret en stor Mængde organiske Forbindelser, henhørende til de mest forskjellige Grupper af Stoffer, og overalt faaet meget gunstige Resultater.

Foranlediget ved Messingers Publikation, anstillede jeg kort efter Forsøg med Methoden, men fandt de dermed erholdte Resultater meget vaklende, idet jeg vel i enkelte Tilfælde fik den beregnede Mængde Kulsyre, medens der langt hyppigere viste sig et betydeligt Deficit. Da der, efter Offentliggjørelsen af Messingers Arbejde, andetstedsfra lød gunstige Beretninger om Methoden, fortsatte jeg i længere Tid mine Forsøg herover med mangfoldige Ændringer, som jeg ikke her skal komme ind paa, da ingen af dem førte til noget positivt Resultat. En Brevvexling mellem Hr. Dr. Messinger og mig tilvejebragte ejheller nogen Opklaring af Uoverensstemmelserne mellem vore Resultater.

Da jeg paa denne Tid havde begyndt at bruge Kvægsølvilte i Forbrændingsovnen og var slaaet af dets hurtige Virkning, forsøgte jeg at supplere Chromsyremethoden derved, at jeg lod Iltningsprodukterne fra Chromsyreblandingen, der altsaa, efter Cross og Bevan indeholdt Kulilte, men sikkerlig tillige Kulbrinter i ringe Mængde, passere et Rør med HgO, der holdtes opvarmet til ca. 400°. Herved fuldstændiggjordes Iltningen let og sikkert, og Resultaterne faldt nu i alle Tilfælde nøje sammen med de beregnede.

Efter at disse Forsøg vare afsluttede, fremkom endnu en Publikation fra Messinger[2]), hvori han, som nu ogsaa i enkelte Tilfælde havde faaet for lave Tal ved Methoden, supplerer sit Apparat med et Rør med Kobberilte, der indskydes mellem Iltningskolben og Kaliapparatet, og holdes glødende ved en Trebrænder. Som det vil ses, er denne Modifikation i Principet ganske den samme, som den, jeg har bragt i Anvendelse, og Meddelelserne herom fra min Side have derved unægtelig tabt en Del i Interesse.

---

[1]) Ber. d. d. chem. Ges. 21, S. 2910.
[2]) Smst. 23, S. 2756.

Imidlertid tror jeg dog, at Kvægsølviltet, hvis Virkning er mere energisk og foregaar ved langt lavere Temperatur, ubetinget er at foretrække for Kobberiltet i dette Tilfælde, selv om det næppe vil fortrænge CuO fra den almindelige Forbrændingsanalyse. Allerede i mine tidligere Ændringsforsøg med Methoden, har jeg prøvet paa at fuldstændiggøre Iltningen ved at indskyde et Rør med Kobberilte, uden at jeg dog derved erholdt fuldt tilfredsstillende Resultater, formodentlig fordi Kobberiltet ikke har været tilstrækkelig stærkt ophedet, eller fordi den deraf anvendte Søjle paa kun $12^{cm}$ har været for kort. Jeg var derfor af den Formening, at det endda kunde have nogen Berettigelse at give en Meddelelse om Kvægsølviltets Anvendelse til denne Art af Analyser, hvilken herefter følger, tilligemed Redegjørelser for nogle andre, mindre Afvigelser i Udførelsen og en Beskrivelse af det af mig anvendte, lidt ændrede Apparat.

Til Forstaaelse af dette tjene de i Texten vedføjede Figurer. Fig. 1 viser Dekompositionskolben, der rummer ca. $150^{ccm}$ og hvori den til en Analyse fornødne Mængde af Kaliumdichromat (10 gr.) tilligemed det lille Glas (a), der indeholder det afvejede Stof, bringes ned, forinden Apparatet samles. I Tilgydningsrøret for Svovlsyren er indblæst et Rør (b) for Tilledning af Luft, som under hele Forsøget i en langsom Strøm ledes igjennem Apparatet. Istedetfor at forbinde dette Tilgydningsrør med Kolben ved en Kautschukprop, der hurtigt angribes ved Stænkning fra Syreblandingen, har jeg foretrukket at forbinde dem med hinanden ved en $3^{1}/_{2}{}^{cm}$ høj Kvægsølvlaas, der ikke med fører denne Ulæmpe og frembyder absolut Garanti for lufttæt Forbindelse. Endelig er Kolbens Hals forsynet med et Siderør (c) til Afledning af Iltningsprodukterne. Disse Kolber med Tilbehør leveres i særdeles god Udførelse fra Glas-Instrumentmager F. C. Jacob i Kjøbenhavn.

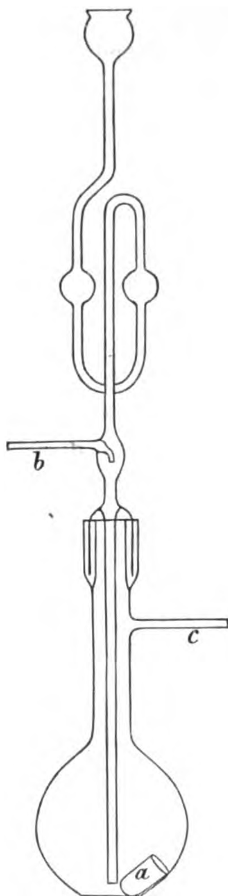


Fig. 1.

Sammenstillingen af Apparatet ses dernæst af Fig. 2. Gasometret tilvenstre leverer Luftstrømmen, der befries fra Kulsyre i

Vaskeflasken A med Natronlud. Mellem denne og Kolben er indskudt en lille Kvægsølvventil B, for at forhindre enhver Diffusion af Kulsyre tilbage til A, Noget, der vel mindre let kan finde Sted her, end ved Forbrændingsrøret, men hvorfor enhver Mulighed dog næppe er udelukket. Dernæst følger selve Dekompositionskolben C, i hvis Siderør man anbringer en lille Asbestprop for at undgaa Stænk af Syre. Luftstrømmen passerer dernæst et U-Rør med 16$^{cm}$ lange Grene, som indeholder det kornede Kvægsølvilte, der skal fuldstændiggjøre Iltningen og som under hele Arbejdet holdes opvarmet til en Temperatur af ca. 400°. U-Røret er til den Ende anbragt i et Luftbad D, hvortil man kan bruge et Messingbæger af den Art, man almindelig bruger ved Mæskningsforsøg, efter at have omgivet det med Asbestpap, hvori man paa den ene Side, der hvor Flammen skal virke, har udsparet en oval Aabning. Fortil lukkes Luftbadet med et Bliklaag, dækket med Asbestpap og forsynet med 2 Huller for U-Røret; ved en lille Fals foroven kan Laaget bekvemt ophænges paa Messingbægerets ombøjede Rand. I Bunden af Bægeret anbringes en lille Bro af Blik for at bære U-Rørets bageste Del, der forøvrigt ved Asbestpap forhindres fra direkte Berøring med det ophedede Metal. Ved en enkelt Bunsensk Lampe holder man let Luftbadet paa den passende Temperatur, der forøvrigt ingenlunde behøver at overholdes nøje. Jeg har engang for Alle overtydet mig om, at den omtalte Temperatur omtrent opnaas ved en slig Lampe, idet jeg nemlig anbragte en lille Digel med Bly og en med Zink imellem U-Rørets Grene, medens Lampen holdtes tændt. Efter en Tids Forløb skulde da Blyet være smeltet, men Zinket ikke, hvilket ogsaa viste sig at være Tilfældet.

Da det altid kun er en ringe Del af Iltningen, der finder Sted i U-Røret, behøver Kvægsølviltet næsten aldrig at fornyes og det med dets Gjenfremstilling forbundne Besvær spiller derfor ingen Rolle ved denne Methode.

Efter Røret med HgO følger Vaskeflasken E med koncentreret Svovlsyre og endelig Absorptionsapparatet F for Kulsyren.

Det er hensigtsmæssigt under hele Arbejdet at kunne vedligeholde et lille Undertryk i Apparatet, for at sikkre sig mod Virkningen af mulige Utætheder ved de mange Forbindelser med Gummislange. Det kan endog, naar man benytter en Dekompositionskolbe med den omtalte Kvægsølvlaas, stundom være nødvendigt paa denne Maade at kunne regulere Trykket i Apparatet, idet Udviklingen af Kulsyre til Tider kan blive saa stærk, at den ellers kunde skaffe sig Udvej gjennem Kvægsølvlaasen eller Tilgydnings-

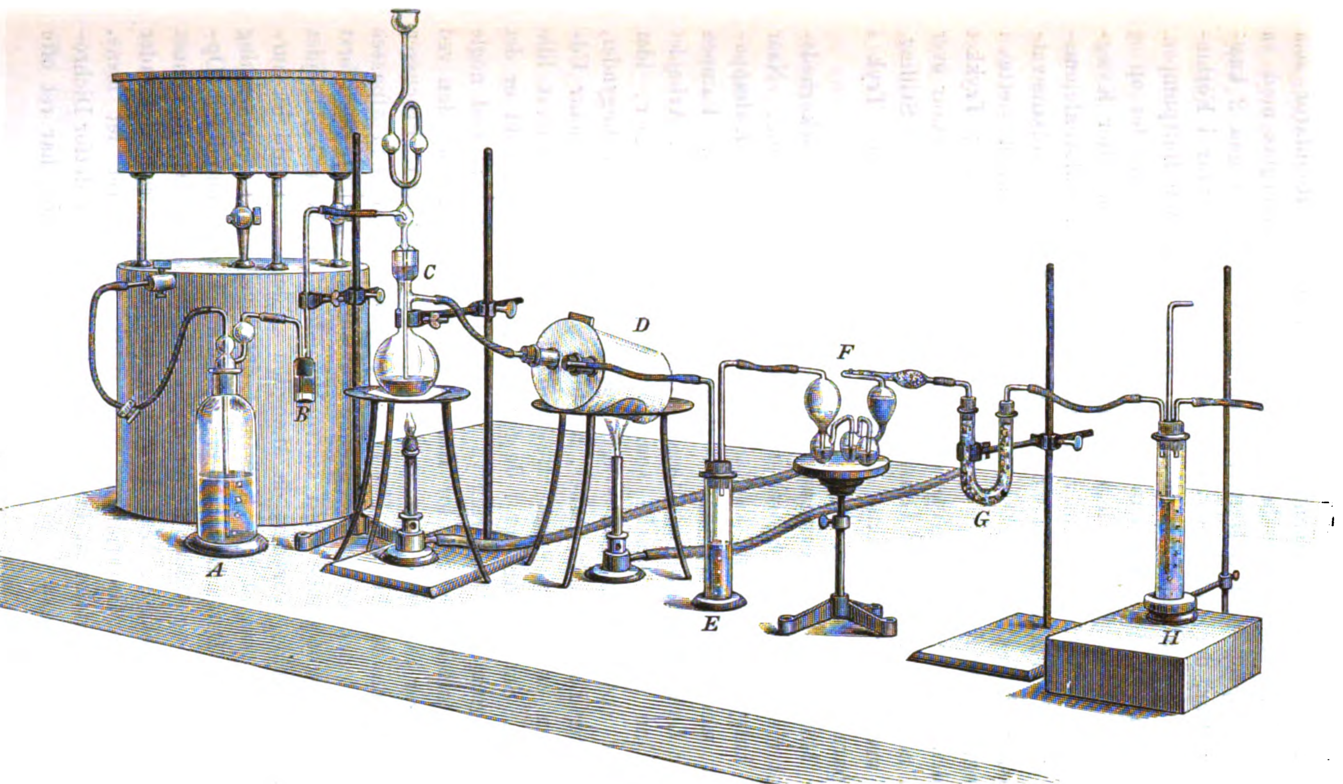



Fig. 2.

røret. Det er derfor ret hensigtsmæssigt at sætte Apparatet i Forbindelse med Vandluftpumpen med den i H viste Regulator som Mellemled. Regulatoren bestaar af et smalt Cylinderglas med en Kautschukprop med 3 Huller. Igennem de 2 Huller gaa 2 knæbøjede Rør, der ende lige under Proppen; det ene staar i Forbindelse med Kaliapparatet F, det andet med Vandluftpumpen. Ijgennem det 3die Hul kan et længere Glasrør skydes let op og ned. I Cylinderglasset bringes koncentreret Svovlsyre eller Kvægsølv; i sidste Tilfælde maa man endnu indskyde et Chlorcalciumsrør G mellem Kaliapparatet og Regulatoren. Naar det sidstnævnte Glasrør skydes et Stykke ned i Vædsken og Pumpen sættes i Gang, vil der fremkomme et Tryk i H lig Atmosfærens ÷ Trykket af den Vædske- (Svovlsyre- eller Kviksølv-) Søjle, der staar over den nederste Munding af Glasrøret; ved at forandre dettes Stilling, vil man derfor let kunne tilvejebringe det forønskede Tryk i Apparatet.

Man bringer nu Kvægsølv i Laasen C og spærrer Sikkerhedsrøret med Svovlsyre, hvorefter Luftstrømmen sættes igang. Naar den kulsyreholdige Luft kan antages fortrængt, forenes Kaliapparatet med det Øvrige, og Svovlsyren ($30^{ccm}$) tilsættes. Lampen under Luftbadet maa være tændt ca. 5 Minutter iforvejen. Arbejdet ledes nu forøvrigt ganske som beskrevet af Messinger, idet Kolben opvarmes ganske svagt, indtil Luftudviklingen begynder, hvorefter Lampen helt fjernes, for først at bruges igjen, naar Udviklingen er bleven svag. Bestandig holdes kun en yderst lille Flamme. Smaa Afvigelser i de forskjellige Stoffers Forhold er det let at iagttage og tage Hensyn til. Saaledes maa man ved nogle varme temmelig længe, før Iltningen begynder, medens den ved andre tager fat strax efter at Svovlsyren er heldt paa. Processen varer i Almindelighed ca. $1^1/_2$ Time, og Opvarmningen maa afpasses saaledes, at det uopløselige, grønne svovlsure Chromtveilte-Kali først da begynder at danne sig i større Mængde. Thi da maa Arbejdet i hvert Tilfælde afbrydes, da Mængden af dette Bundfald nu hurtigt tiltager, saa at hele Kolbens Indhold ved fortsat Opvarmning vilde stivne. Dette Bundfald er uopløseligt i alle almindelige Opløsningsmidler og volder derfor noget Besvær, naar det har dannet sig i større Mængde. Lidt deraf kan ikke undgaas, men det lader sig ved nogen Opvarmning med stærk Natron ret let løsne. Ullgren[1]) anbefaler at bruge kalifri Chromsyre istedetfor Dichromat, for at undgaa dette ubehagelige Bundfald. Jeg har ret ofte

[1]) l. c.

benyttet Chromsyre ved disse Forsøg, og fundet, at det grønne Bundfald dannede sig ligesaa vel hermed, som med Dichromat. Undersøgt for Kali viste denne Chromsyre sig kun at indeholde Spor, det grønne Bdf. maa i dette Tilfælde have bestaaet af uopløseligt svovlsurt Chromtveilte[1]).

Naar man anvender koncentreret Svovlsyre, synes det af Ullgren og Messinger anvendte, opadstigende Svalerør paa Kolben temmelig overflødigt, naar det da ikke er let flygtige Stoffer, der analyseres.

Nedenfor gives nogle Bilag af Analyser, udførte dels med, dels uden HgO. Ved hvert Stof er anført den fundne og den beregnede Kulsyremængde i Milligram, og det vil ses, at medens de 2 Tal kun i enkelte Tilfælde stemme overens ved Analyserne «uden HgO», er der mellem de 2 Kolonner «med HgO» den bedste Overensstemmelse. Ved Eddikesyre, Alkohol og Æther anvendtes et opstigende Svalerør mellem Kolben og U-Røret. Ved saltsurt Fenylhydrazin blev ClH optaget i et Rør med vandfrit $CuSO_4$. Forøvrigt erindres, at Kvælstof-holdige (saavel som Svovl- og Fosfor-holdige) Stoffer analyseres ganske paa samme Maade som Kvælstof-fri.

| | »Uden HgO«, fundet. | beregnet. | »Med HgO«, fundet. | beregnet. |
|---|---|---|---|---|
| Rørsukker........... | 410 | 411 | 405 | 402 |
| do. ........... | 309 | 338 | 360 | 359 |
| do. ........... | 380 | 396 | 434 | 436,5 |
| Glycerin ............ | 375 | 405 | 477 | 482 |
| Citronsyre........... | 301 | 335 | 433 | 435 |
| Benzoesyre.......... | 412 | 419 | 556 | 553 |
| Salicylsyre .......... | 402 | 445 | 522 | 522 |
| Hippursyre .......... | 370 | 377 | 491 | 494 |
| Urinstof ............ | 184 | 183 | 258 | 259 |
| Anilin .............. | 448 | 461 | 501 | 503 |
| Caffëin ............. | 295 | 293 | 311 | 312 |
| Eddikesyre.......... | — | — | 386 | 391 |
| Æthylalkohol ........ | — | — | 608 | 610 |
| Æther.............. | — | — | 541 | 545 |
| Saltsurt Fenylhydrazin | — | — | 360 | 358 |

[1]) Gmelin-Kraut, Handb. d. Ch. 2te Bd. 2te Abtb., S. 297 og S. 310.

# Biologiske og gjæringstekniske Analyser af Vand til Bryggeribrug.

Af

Just Chr. Holm.

## I. Fremgangsmaaden.

I Begyndelsen af Aaret 1888 fremsatte Prof. Dr. E. Chr. Hansen i Zeitschrift für das gesammte Brauwesen sin Opfattelse af, hvorledes en Analyse af Vandet i Bryggerier bør foretages, og han angav samtidig hermed en Methode til zymoteknisk Brug. Han viste, at den tidligere almindelig anvendte, af Koch angivne, hygiejniske Methode ikke kan benyttes, naar Talen er om en Analyse i ovennævnte Øjemed, idet man, hvis man betragter Sagen fra et zymoteknisk Standpunkt, strax maa komme til det Resultat, at Spørgsmaalene, som stilles her, ere ganske andre end de, som komme frem ved den bakteriologisk-hygiejniske Undersøgelse af Drikkevandet, og at Methoden derfor ogsaa nødvendigvis maa blive en anden. Forøvrigt henvises Læseren til Hansens nye Afhandling om dette Æmne i nærværende Tidsskrift 1892 S. 149.

Denne Methode er i alt væsentligt ogsaa bleven benyttet af mig ved den temmelig betydelige Række af Analyser over forskjellige Vandprøver fra Carlsberg Laboratoriets og Bryggeriet Gamle Carlsbergs Vandbeholdere og Ledninger, som jeg har foretaget i et længere Tidsrum.

Mine Forsøgsrækker ere anstillede i Tidsrummet fra Januar 1888 til Oktober 1889 samt fra Februar til Juni 1891, og Prøverne ere dels tagne fra Laboratoriets Ledninger, dels ogsaa fra Vandledninger saavel i Gamle Carlsbergs Hovedbryggeri som i det dertil hørende Annexbryggeri. Laboratoriet forsynes med Vand fra en

ca. 100' dyb artesisk Brønd i den til Gamle Carlsberg hørende og umiddelbart ved Bryggerierne liggende store Have. Den samme Brønd forsyner ogsaa tildels Hovedbryggeriet, dog tilføres der dette sidste tillige Vand fra en ved Annexbryggeriet beliggende Brønd, saaledes at Vandet fra denne i en fælles Beholder blandes med Vandet fra Brønden i Haven; Annexbryggeriet forsynes udelukkende fra den dertil hørende nys nævnte Brønd. Analyserne ere foretagne dels umiddelbart før og efter Beholdernes Rensning, dels i Mellemtiden.

Førend Prøverne toges, bleve Ledningsrørene og de derpaa siddende Vandhaner og Slanger omhyggeligt afvaskede udvendigt. At Experimentators Hænder og Klæder vare vel rensede, saavelsom at Luften i Værelset var i fuldstændig Ro, er en Selvfølge.

Jeg aabnede for Vandet længere Tid førend Prøverne toges (ca. 1 Time), saaledes at Ledningen var udskyllet ved Prøvetagningen. Man maa dog erindre, at man ikke har det i sin Magt med Sikkerhed at udtage en Gjennemsnitsprøve af Beholderen, og altsaa endnu mindre af Brønden, hvorfra Vandet pumpes op. Denne Mangel dele Analyserne af Vandet med de tilsvarende af Luften. Vi kunne ikke heller af Lufthavet paa et bestemt Sted erholde de ønskede Gjennemsnitsprøver, ikke at tale om, at der er en uafbrudt Skiften. Dog viser i begge Tilfælde Erfaringen, at man kan opnaa værdifulde Resultater, naar Analysernes Antal ikke er for lille. Det er dog rigtigt at være klar over den her berørte Indskrænkning for at kunne vurdere Resultaterne paa rette Maade. At der ogsaa kan indtræde Vanskeligheder ved Udtagning af Gjennemsnitsprøver af selve den Vandmængde, som benyttes til de enkelte Analyser, skal jeg ogsaa her gjøre opmærksom paa. Disse Vanskeligheder kunne blandt andet ligge deri, at Kimene paa Grund af Slimindhylningen hænge sammen og derfor undertiden ikke ved Rystning af Vædsken blive spredte. Dog lader en saadan Spredning sig lettere opnaa i Vædsker end i Gelatine.

Prøverne toges i steriliserede Chamberlandske Kolber, disse ere paa Grund af deres overgribende Hætte heldigere end de tidligere anvendte Erlenmeyerske Kogeflasker med Vatprop, hvor Talen er om en øjeblikkelig Analyse paa Stedet strax efter Prøvetagningen; ved Forsendelse af Vandet maa steriliserede Glasflasker med tilsleben Glasprop anvendes. Miquel har (Manuel pratique d'analyse bactériologique des eaux, Side 25—28. Paris. 1891) beskrevet og afbildet særegne til Transport af saadanne Vandprøver konstruerede Hylstre med dertil hørende Flaske.

Efter at Kolben med Vandet er godt omrystet, tages Prøver ud deraf med sterile Pipetter, som foroven ere forsynede med en steril Vatprop og desuden med en lille Kautschukslange med Vatprop i den øverste Ende, igjennem hvilken man suger; denne Slange behøver ikke at være steriliseret. Ved den beskrevne Indretning undgaar man, at Munden kommer i Berøring med Vatproppen i Pipetten, ligesom ogsaa Mundvædsken holdes tilbage af Vatproppen i Slangen. Kolben rystes naturligvis for hver Gang Prøver tages, og Pipetten føres ligeledes hver Gang først hurtig gjennem en Flamme. Man gjør bedst i kun at anvende den samme Pipette til nogle faa Kolber. For at arbejde med saa rolig Luft som mulig anvendte jeg altid under Forsøgene den af Hansen konstruerede Infektionskasse (Meddel. fra Carlsb. Laborat. II. Bd., 4. Hefte, Side 155, 1886).

Som Næringsvædsker anvendtes steriliseret Sipose-Urt og steriliseret Lagerøl i de saakaldte Freudenreichs Kolber. Disse steriliseredes i en Avtoclav ved ca. 125° C. i 1/4 Time. Da det under Forsøgene havde vist sig, at det i Urten under Sterilisationen opstaaede Bundfald kunde bevirke, at man ikke altid med Sikkerhed formaaede at afgjøre, om en Vegetation havde udviklet sig deri eller ej, anvendte jeg en Urt, som først blev steriliseret i store Beholdere og derfra, naar Bundfaldet havde sat sig, blev aftappet i sterile Kolber. Disse henstod længere Tid til Observation, inden de benyttedes, for at jeg kunde overbevise mig om, hvorvidt de vare sterile eller ikke. Ved denne Sterilisation mister Øllet en Del af sin Alkoholmængde. Det viste sig saaledes ved Forsøg, som jeg i den Anledning foretog, at Øl, der før Sterilisationen indeholdt 5—6 Vol. % Alkohol, efter denne kun indeholdt 2.8 Vol. %. Øllets desinficerende Evne er herved bleven svækket; desuagtet viste det sig dog i høj Grad modstandsdygtigt — mere end den humlede Urt — lige overfor de forskjellige i Vandet værende Kim, særlig lige overfor Bakterierne. Ogsaa Kulsyre, der som bekjendt ligeledes virker desinficerende, tabes ved denne Proces. Koncentrationen forandres ikke i væsentlig Grad ved Sterilisation i Avtoclaven. Vi kunne heraf slutte, hvor gunstigt Øllet i sin naturlige Tilstand er stillet lige overfor Angreb af Bakterier. Heldigst vilde det naturligvis være, om man ved disse Forsøg kunde anvende Øl uden foregaaende Sterilisation. Dette har jeg ogsaa lejlighedsvis forsøgt. Det almindelige Lagerøl blev da gjennem en steril Tragt overført i en ligeledes steril trehalset Flaske, hvis anden Hals var forsynet med Vatfilter, og gjennem hvis tredie Hals man ved Hjælp af et bøjet Glasrør og Slange (med Klem-

hane), som endte med et tilspidset Glasrør (alt naturligvis i Forvejen steriliseret), atter kunde aftappe det opsamlede Øl paa sterile Freudenreichs Kolber. Denne sidstnævnte Operation foretoges i den før omtalte Kasse. Der fyldtes paa denne Maade 40 Freudenreichs Kolber, af hvilke 20 strax inficeredes hver med ½ ccm. Ledningsvand, medens de andre 20 benyttedes som Kontrolkolber, og alle stilledes ved ca. 21° C. Efter 3 Døgn fandtes de imidlertid alle 40 bedækkede med en Hinde af Mycoderma cerevisiae og Bakterier (Bact. aceti), medens Vædsken var klar. Denne Infektion var aabenbart ikke paaført Øllet under Paafyldningen, men skyldtes en Udvikling af Organismer, som oprindelig vare tilstede i Øllet selv. Udviklingen var en Følge af den ved Manipulationerne frembragte Luftning og den paafølgende gunstige Temperatur. Det viste sig saaledes, at denne Methode ikke kunde benyttes. Der gjordes derefter et Par Forsøg med Lagerøl, der ved svag Opvarmning var bleven behandlet som det almindelige pasteuriserede Øl i Praxis. Disse Forsøg udførtes iøvrigt paa samme Maade som ovenfor beskrevet. I Kontrolkolberne med det pasteuriserede Øl optraadte der altid Skimmelvegetation, i den ene Analyse tillige for nogle Kolbers Vedkommende Torula, pastoriane Gjærceller og Bakterier; Øllet havde i dette Tilfælde en sur Lugt. Denne Opvarmning er som bekjendt nemlig ingen Sterilisation. Heller ikke paa den Maade lod Øllet sig altsaa anvende, der var da ikke andet at gjøre end at benytte Sterilisation, hvis man ikke vil anvende en Filtration gjennem Chamberlands Filter, hvorved noget af Kulsyren og Alkoholen gaar bort og Vædskens kemiske Sammensætning desuden forandres.

Den Fortynding, som Vædskerne lide ved Tilsætningen af det Vand, som skal undersøges, har ogsaa nogen Betydning, idet derved deres desinficerende Evne svækkes, om end kun i ringe Grad, og det Spørgsmaal trænger sig derfor ganske naturligt frem: Hvormegen Vædske, ɔ: Urt eller Øl, kunne Kolberne paa en passende Maade optage, og hvormeget Vand kunne vi ved vore Analyser sætte til hvert Maal af disse Vædsker? Mest rationelt vilde det jo være at arbejde med saa store Kvantiteter Urt og Øl og saa ringe en Vandmængde, at Fortyndingen ingen Rolle spillede lige overfor Vædskernes Sammensætning, men det lader sig ved disse Analyser, hvor et stort Antal Kolber skulle benyttes, ikke gjøre. Det bliver da altsaa Spørgsmaalet om Fortyndingsgraden, vi skulle afgjøre. Hvormeget kunne vi fortynde uden i kjendelig Grad at formindske Urtens og Øllets desinficerende Virkning? Vore Kolber rumme med Lethed 15 ccm. Vædske — det gjælder jo om at have saa megen Vædske som muligt — og jeg har da under de fore-

liggende Omstændigheder fundet, at man for Urtens Vedkommende kan sætte 1/8 ccm. Vand, for Øllets 1/2 ccm. Vand til uden derved at ophæve disse Vædskers desinficerende Evne. Det vil med andre Ord sige, at Urten kunde taale en Fortynding af 1 Liter Vand pr. 120 Liter, Øllet derimod en Fortynding af 1 Liter Vand pr. 30 Liter, uden at denne Evne ophæves. En lille Nedgang finder vel Sted herved, og de fundne Tal blive derfor idetmindste for nogle af Mikroorganismernes Vedkommende lidt for høje.

I mine Forsøg indførte jeg derfor i hver Urtkolbe 1/8 ccm. og i hver Ølkolbe 1/2 ccm. af Vandprøven. Det viste sig imidlertid allerede ved nogle af de første Forsøgsrækker, at Vandet kunde være saa slet, at en Fortynding af dette var nødvendig, inden Udsæden i Vædskerne foretoges, idet nemlig stundom alle Kolberne efter Udsæd af henholdsvis 1/8 ccm. og 1/2 ccm. Ledningsvand bleve inficerede med Organismer. Derfor overførtes en vis Del af Vandmængden først i sterilt Vand, saaledes at 1/8 ccm. af Blandingen kom til at indeholde 1/32 ccm. af den til Analysen udtagne Vandmængde (3 Dele sterilt Vand til 1 Del Ledningsvand), og med denne Blanding foretoges da Udsæd samtidig med den almindelige Udsæd fra selve Ledningsvandet. Denne Fremgangsmaade brugtes dog kun lige overfor Laboratoriets Ledningsvand paa en Tid, da dette var meget urent paa Grund af Arbejder ved Brønden, men jeg kan ikke undlade at omtale det her, da en saadan i zymoteknisk Henseende slet Vandprøve kan forekomme; man gjør derfor rettest i, naar Vandets Rigdom paa Organismer, der ere udviklingsdygtige i Urt og Øl, er ubekjendt, at anvende den beskrevne Forsigtighedsregel i de første orienterende Analyser.

Der inficeredes til hver Analyse 15 Urtkolber og 10—15 Ølkolber; det første Antal Ølkolber er tilstrækkeligt. Efterat Kolberne vare rystede, henstilledes de ved ca. 25° C., indtil Undersøgelsen foretoges.

Medens en stor Del af de af Vandets Kim, som overhovedet udvikle sig i Næringsgelatiner, først komme sent til Udvikling i disse, er Forholdet, naar man opererer med Vædsker, et helt andet. Miquel angiver (Dixième mémoire sur les poussières organisées de l'air et des eaux. Annuaire de Montsouris. 1888.), at i Følge hans Tabeller, som indbefatte Resultatet af 60000 parallele Iagttagelser, udviklede 10 % af Vandets Kim sig først fra den 15de—30te Dag i Gelatinen, og i »Manuel pratique d'analyse bactériologique des eaux«, Side 33, Paris, 1891, bemærker han, at naar man afbryder Forsøget, hvad man ofte kan være nødt til, efter den første Uges Forløb, kommer man ikke til at tage Hensyn til 1/4 af de

Kolonier, som endnu i uudviklet Tilstand findes skjulte i Gelatinemassen. Ogsaa Hansen omtaler i sin i Begyndelsen af denne Afhandling nævnte Methode til Analyse af Bryggerivandet med Hensyn til Mikroorganismer, at man nødvendigvis maa fortsætte Gelatinekulturen længere, end der sædvanlig angives, hvis man ad den Vej vil opnaa nøjagtig Oplysning om Bakterieindholdet, thi efter 4 Dage fandtes kun $^1/_{10}$ af det Antal Vegetationer, som havde udviklet sig efter 10 Dage, og kun $^1/_{15}$ af dem, der vare tilstede efter 16 Dage.

Disse Misligheder hæves som sagt ved at benytte Vædske til Forsøgene; ogsaa kan man i saa Tilfælde om fornødent anvende højere Varmegrader, hvad der for de almindelige Gelatinekulturer ikke lader sig gjøre.

Med Hensyn til de her omtalte Forsøgsrækker og de benyttede Vædsker gjorde jeg den Iagttagelse, at allerede efter 2—4 Døgn ved 25° C. gave Urtkolberne Udslag for Bakterier, enkelte Gange dog først efter det 7de Døgn; Ølkolberne, i hvilke disse, som foran omtalt, optræde sjældent og i ringe Mængde, viste først Tegn til Infektion efter 7—11, sjældent allerede efter 5 Døgn. Vædskerne bleve da uklare, affarvedes, og der dannedes stundom Hinde. Først senere kom Skimmelvegetationerne frem, og navnlig udviklede disse sig meget langsomt og ofte yderst sparsomt i Ølkolberne efter det 7de Døgn. De gjærlignende Celler vare ikke altid lette at opdage ad makroskopisk Vej, Gjæringsfænomener indtraadte ikke, og deres Udvikling var ofte ringe. Hvis der er Bundfald i Kolberne, ville navnlig disse Vegetationer let kunne skjules. Jeg har i mine meget talrige Forsøg ingensinde iagttaget, at der fandt nogen Udvikling Sted i Kolberne efter det 14de Døgn.

For Praxis vilde det have stor Betydning, om Analyserne kunde afsluttes hurtigere end efter 14 Døgn. Jeg anstillede derfor Forsøg for at undersøge, hvorvidt der efter det 7de Døgn udviklede sig Organismer eller ej i de benyttede Vædsker Urt og Øl. Det viste sig da for Urtens Vedkommende, at af 360 Kolber optraadte der Udvikling i 28 (nemlig Bakterieudvikling i 14, Skimmelvegetationer i 12 og gjærlignende Celler i 2) efter det nævnte Tidsrum; for Øllets Vedkommende bleve af 240 Kolber 33 inficerede (deraf 32 med Skimmel og 1 med Bakterier). Det er altsaa ikke ganske ligegyldigt, om man afslutter Undersøgelsen paa dette Tidspunkt, i hvor vel man nok kan sige, at Hovedresultatet er naaet efter 7 Døgn.

Et andet Spørgsmaal er dette, om man ikke kan indskrænke Analysen til Benyttelsen af Urt alene, og dette mener jeg, at man i Praxis kan gjøre, selv om der i enkelte Tilfælde vil indtræde

en lille Fejl. Blandt mine 106 Forsøgsrækker med 1060 Ølkolber optraadte der kun i 14 Kolber Skimmeludvikling, i 8 Kolber gjærlignende Celler og i 4 Kolber, som imidlertid alle hørte til een Forsøgsrække, Bakterier, medens disse Organismer ikke optraadte i de samtidige Urtkolber, og kun i en eneste Ølkolbe optraadte der en ringe Skimmeludvikling, medens de øvrige til samme Forsøgsrække hørende Urt- og Ølkolber aldeles ingen Infektion havde at opvise. Disse Arter vare dog uden Tvivl Former, som kunde have udviklet sig ogsaa i Urt; Organismer, som kun kunde udvikle sig i Øl, iagttoges altsaa ingensinde.

Det viste sig nu og da under Forsøgene, at uagtet ikke alle de til en Række hørende Kolber fostrede Vegetationer, og Spredningen altsaa var bleven udført saa fuldkomment, som det var muligt, indeholdt dog i flere Tilfælde de inficerede Kolber ikke Renkulturer, idet der nemlig i en og samme Kolbe fandtes to forskjellige Mikroorganismer f. Ex. Bakterier og gjærlignende Celler eller Bakterier og Skimmelsvampe. Man kan altsaa ikke slutte, som Lister, Nägeli, Fitz og andre have gjort, at, naar ved Draabeudsæd ikke alle Kolber blive inficerede efter en foregaaende stærk Rystning af Infektionsvædsken, de i denne Vædske suspenderede Organismer i saa Tilfælde ere blevne fordelte saaledes, at der kun er bleven udsaaet i det højeste een Kim i hver inficeret Kolbe. Disse Iagttagelser spille en vigtig Rolle i Rendyrkningsmethoderne; jeg har derfor ogsaa udtalt mig udførligt derom i min Afhandling: »Om Rendyrkningsmethoderne og særlig om Kochs Pladekultur og dens Fejlgrændse« (Meddel. fra Carlsb. Laborat. III Bd., 1. Hefte, S. 1, 1891).

En mikroskopisk Undersøgelse er naturligvis nødvendig lige overfor de inficerede Kolber, hvis man vil have nøjagtig Underretning om, hvilke af de forskjellige i Vandet værende Organismer der kunne udvikle sig i Urt og Øl; men ogsaa lige overfor de fuldstændig blanke og tilsyneladende sterile Vædsker, hvor heller ikke en Hindedannelse har fundet Sted, maa en saadan Undersøgelse foretages. Jeg fandt en enkelt Gang i to tilsyneladende sterile Urtkolber en meget ringe Udvikling af Torulaformer. Den svage Formering, som havde fundet Sted, var aldeles skjult i det Bundfald, der, som berørt, fremkommer under Sterilisationen i Urtkolberne, naar klar Urt ikke anvendes.

Gelatinemethoden giver fejle Resultater. Hvad specielt Urtgelatinen angaar, da er denne en noget bedre Næringsbund for nogle Bakteriearter end Urten, og flere af de i Vandet værende Bakterier, som ikke komme til Udvikling i denne, ville kunne ud-

vikle sig i hin; endnu heldigere for Bakterieudviklingen er den neutrale Kjødvandspeptongelatine. Omvendt ville i mange Tilfælde Gjærceller, for hvilke Gelatinen er en slettere, Urten derimod en bedre Næringsbund, ikke eller kun vanskeligt udvikle sig i hin men derimod let i denne. Dette har saaledes vist sig ved de af Hansen foretagne nye Undersøgelser over Sacch. apiculatus og dens Kredsløb i Naturen (Nouvelles recherches sur la circulation du Sacch. apiculatus dans la nature. Ann. des sciences naturelles Botanique. Ser. VII., T. XI, Nr. 3, S. 185, 1890), idet indtørrede og svækkede Celler af denne Art fra Jordprøver meget hurtigt kom til Live i Urt, men derimod slet ikke i Urtgelatine. Selv har jeg ogsaa anstillet Forsøg med forskjellige Saccharomyceter, dels Sygdomsformer dels Kulturgjærarter, i svækket Tilstand og faaet lignende Resultater som de ovenfor af Hansen fundne. Af disse Forsøg skal jeg anføre ganske enkelte.

Unge, kraftige Celler af Sacch. Pastorianus III udsaaedes i sterilt Vand og henstilledes ca. 20 Uger ved en Temperatur af 8—10° C. Da der efter den Tid foretoges en mikroskopisk Undersøgelse, viste det sig, at der i flere Celler var dannet Sporer, andre saa derimod ud til at være døde. Ved paafølgende Udsæd af dette Vand i Urt, Urtgelatine og Kjødvandspeptongelatine viste det sig, at i Urten indtraadte der en hurtig og kraftig Udvikling af Gjæren, i Urtgelatinen var Gjærudviklingen derimod mindre kraftig, og i Kjødvandspeptongelatinen fandt der en meget langsom Udvikling af Gjæren Sted. Jeg anvendte ogsaa til disse Forsøg med svækkede Celler nogle gamle Filtrerpapirspræparater, som indeholdt Sporekulturer af Saccharomyceter. Saaledes prøvedes ca. 1 Aar gamle Sporepræparater af Sacch. Pastorianus I og Sacch. ellipsoideus II; Sporerne vare meget svækkede, idet de i Urtkulturer først efter 5—6 Døgn ved 25° C. viste Tegn til Liv (Formering og Gjæring). Resultatet var, at Urtkulturerne gav tidligere og kraftigere Udvikling end Urtgelatinekulturerne. Endnu mere slaaende Resultater i den nævnte Retning gave nogle Filtrerpapirspræparater af vegetative Celler af forskjellige Kulturgjærarter fra sydtyske Bryggerier. Enten vare Gjærcellerne døde, eller de kom kun til Udvikling i Urten, derimod ikke i Næringsgelatinerne. Disse Forsøg vise altsaa, at for Gjærens Vedkommende er Urten en bedre Næringsbund end Gelatinerne; man faar altsaa ogsaa af den Grund for Gjærens Vedkommende et fejlt Resultat, hvis man ved den zymotekniske Undersøgelse af Bryggerivandet vil anvende Gelatinemethoden.

Et slaaende Exempel paa at man, naar man anvender Gelatinemethoden, kan faa aldeles urigtige Resultater ved zymotekniske Vandundersøgelser, findes i den Sammenstilling af de ved Kochs hygiejniske og Hansens zymotekniske Methode erholdte Resultater ved Analysen af Bryggerivand, som Fr. Schwackhöfer giver i sin Afhandling: »Beitrag zur Beurtheilung des Wassers für die Zwecke der Brauerei und Mälzerei« (Mittheil. der oesterr. Versuchsstation für Brauerei und Mälzerei in Wien. Heft III. 1890).

Et urigtigt Resultat faas ogsaa, hvad der fremgaar af ovenstaaende, hvis man, som nogle Zymoteknikere have ment at burde gjøre, forbinder begge Methoder med hinanden, saaledes at man først udsaar fra Vandet i Urtgelatinen og dernæst fra de i denne udviklede Pletter foretager Udsæd i Urt og Øl for senere at undersøge, hvilke af de i Gelatinen udviklede Organismer der kunne udvikle sig i disse Vædsker. De svækkede Bakterier, som ikke vilde have kunnet udvikle sig i Vædskerne, men som ere komne til Kræfter i Gelatinen, ville nu ved Udsæd derfra kunne give Udvikling i Urten og Øllet; vi faa altsaa et for stort Udslag for Bakterier, og de svækkede Gjærceller, som ikke kom til Udvikling i Gelatinen, men som vilde have udviklet sig i Urten, kunne altsaa ikke overføres fra hin i denne, og følgelig giver denne Methode et for ringe Udslag for Gjærceller. Tillige giver den et meget større og overflødigt Arbejde.

Der er i en Kolbes Vædske rig Lejlighed for to Kim af samme eller af forskjellig Art til at udvikle sig ved Siden af hinanden, og, som ovenfor sagt, indtræffer det Tilfælde stundom, at man i en af Urtkolberne finder baade Skimmelformer eller Gjærceller og tillige Bakterier; angaaende disse sidste tør vi imidlertid i saa Tilfælde ikke direkte slutte, at de ere Urtbakterier, det vil sige Bakterier, som kunne udvikle sig i Urten, thi de have mulig først udviklet sig, efter at Urten ved Skimmelformernes eller Gjærcellernes Livsvirksomhed var bleven omdannet, altsaa ikke længere var, hvad vi forstaa ved Urt, og de vilde maaske ikke være komne til Udvikling, hvis ovennævte Organismer ikke tillige havde været tilstede. Saadanne Tilfælde har jeg derfor ikke regnet med i mine Forsøg.

Efter 14 Døgns — for nogle Forsøgsrækkers Vedkommende tillige efter 7 Døgns — Henstand ved ca. 25° C. bleve de med Vandet inficerede Urt- og Ølkolber undersøgte dels makro- dels mikroskopisk, og Antallet af inficerede Kolber noteredes tillige med det i disse forefundne Indhold; Antallet af Vegetationer af de forskjellige Organismer beregnedes dernæst for 1 ccm. af Vand-

prøven. Antallet af disse Forsøgsrækker var 100; Prøverne vare, som tidligere bemærket, dels tagne fra Laboratoriets Ledning (50), dels fra de to Bryggerier (50). Ved de i det følgende Afsnit (under A.) meddelte Resultater har jeg ikke medtaget nogle andre Forsøgsrækker, som bleve foretagne med det gjennem et Kuntzes Filter filtrerede Vand (18), og heller ikke enkelte i en speciel Hensigt udførte Analyser (3); om de Oplysninger, som disse sidstnævnte Forsøg bragte, tales andetsteds i denne Afhandling.

## II. Resultaterne.

I dette Afsnit ville følgende Spørgsmaal blive behandlede:

A. Hvilke af de i Vandet værende Organismer kunne udvikle sig i Urt og Øl, hvilke af disse Organismer optræde hyppigst, og i hvor stor Mængde (Antal af Vegetationer, som udvikles ved Udsæd af 1 ccm. Vand) optræde de i disse Vædsker?

B. Findes der Bakterier, ægte Saccharomyceter og andre Gjærceller og overhovedet nogle af de for Urt og Øl skadelige Arter blandt disse Organismer?

C. Forskjellige Faktorers Indflydelse paa Vandvegetationernes Udvikling.

D. Forsøgenes Betydning for Praxis.

A. Hvilke af de i Vandet værende Organismer kunne udvikle sig i Urt og Øl, hvilke af disse Organismer optræde hyppigst, og i hvor stor Mængde (Antal af Vegetationer pr. ccm.) optræde de i disse Vædsker?

I Urt og Øl optraadte under mine Forsøg Bakterier, Skimmelsvampe og gjærlignende Celler (Torula og Mycodermaformer), derimod ikke Saccharomyces-Arter.

I Urt. De i denne Vædske hyppigst forekommende Organismer ere Bakterier og Skimmelformer, langt sjældnere optræde gjærlignende Celler.

Bakterier. I Vandet fra Laboratoriets Ledninger optraadte disse Organismer i størst Mængde. Af 50 Forsøgsrækker fandtes der i 16 ingen Bakterieudvikling, i de andre 34 varierede Antallet af Vegetationer fra 20.8—0.3 pr. ccm.; Middeltallet af alle Forsøgsrækkerne var 2.9 Vegetationer pr. ccm. Af de 25 Forsøgsrækker fra Hovedbryggeriets Ledninger fandtes 8 uden Bakterieudvikling,

Resten indeholdt fra 5.4—0.5 Vegetationer pr. ccm., og Middeltallet af Forsøgsrækkerne var 1.2 *Vegetationer pr. ccm.* Blandt de 25 Forsøgsrækker fra Annexbryggeriets Ledninger fandtes 11 uden Bakterieudvikling, Resten indeholdt fra 6.9—0.5 Vegetationer pr. ccm., og Middeltallet af Forsøgsrækkerne var 0.9 *Vegetationer pr. ccm.*

*Skimmelsvampe.* I Vandet fra Laboratoriets Ledninger fandtes blandt 50 Forsøgsrækker 7, i hvilke disse ikke optraadte, i de øvrige 43 varierede Antallet af Vegetationer fra 8.4 - 0.4 pr. ccm.; Middeltallet af alle Forsøgsrækkerne var 2.4 *Vegetationer pr. ccm.* I Vandet fra Hovedbryggeriets Ledninger var Forholdet følgende: Skimmelformer optraadte i 24 af 25 Forsøgsrækker, Antallet af Vegetationer varierede fra 7.2—0.4 pr. ccm., og Middeltallet af alle Forsøgsrækkerne var 3.1 *Vegetationer pr. ccm.* Fra Annexbryggeriets Ledninger gav Vandet følgende Resultat: Af de 25 Forsøgsrækker indeholdt 9 ingen Skimmelvegetation, hos de andre varierede Antallet af Vegetationer fra 4.8—0.5 pr. ccm., og Middeltallet af alle Forsøgsrækkerne fandtes at være 1.8 *Vegetationer pr. ccm.*

*Gjærlignende Celler.* Hvad endelig disse angaar, da optræde de i ringe Antal og mangle aldeles i mange af Analyserne. I Vandet fra Laboratoriets Ledninger fandtes blandt 50 Forsøgsrækker 33, som ikke indeholdt disse Organismer, hos Resten varierede Antallet fra 4.4—0.3 Vegetationer pr. ccm.; Middeltallet af Forsøgsrækkerne var 0.4 *Vegetationer pr. ccm.* Fra Hovedbryggeriets Ledninger indeholdt af 25 Forsøgsrækker 18 ikke gjærlignende Celler; hos de andre varierede Antallet fra 2.8—0.5 Vegetationer pr. ccm., og Middeltallet af Forsøgsrækkerne var 0.4 *Vegetationer pr. ccm.* Hvad Vandet fra Annexbryggeriets Ledninger angaar, fandtes i 25 Forsøgsrækker 17, som ikke indeholdt ovennævnte Former, hos Resten varierede Antallet af Vegetationer fra 1.1—0.5 pr. ccm. Middeltallet af alle Forsøgsrækkerne var 0.3 *Vegetationer pr. ccm.*

*I Øl.* Da denne Vædske er i Besiddelse af en langt større desinficerende Evne end Urten, optræde Formerne her i et ringere Antal.

*Skimmelsvampe.* Af alle Organismerne optræde disse hyppigst. Af de 50 Forsøgsrækker, som bleve udførte med Vand fra Laboratoriets Ledninger, fandtes kun 8, som ikke indeholdt disse Former, blandt Resten varierede Antallet fra 5.0—0.1 Vegetationer pr. ccm., og Middeltallet af alle Forsøgsrækkerne var 0.7 *Vegetationer pr. ccm.* I alle 25 Forsøgsrækker fra Hovedbryggeriets

Ledninger fandtes Skimmel[1]), Antallet af Vegetationer varierede fra 1.8—0.1 pr. ccm., og Middeltallet af Forsøgsrækkerne var 1.0 Vegetationer pr. ccm. Blandt de 25 Forsøgsrækker fra Annexbryggeriets Ledninger fandtes 14, i hvilke ingen Skimmeludvikling havde fundet Sted, i de andre 11 varierede Antallet fra 1.8—0.2 Vegetationer pr. ccm., og som Middeltal af alle Forsøgsrækkerne fandtes 0.3 Vegetationer pr. ccm.

Gjærlignende Celler. Sjældnere optræde de gjærlignende Celler og Bakterierne i Øl; disse to Former ere imidlertid omtrent lige hyppige og optræde kun i de færreste Analyser. Hvad de gjærlignende Celler angaar, fandtes disse kun i 12 af de 50 Forsøgsrækker, som vare udførte med Vand fra Laboratoriets Ledninger. Antallet af Vegetationer varierede fra 0.7—0.2 pr. ccm., og Middeltallet af Forsøgsrækkerne var 0.09 Vegetationer pr. ccm. I Vandet fra Hovedbryggeriets Ledninger fandtes de kun i 2 af 25 Forsøgsrækker i et Antal af 0.1 Vegetationer pr. ccm. Middeltallet af alle Forsøgsrækkerne var 0.01 Vegetationer pr. ccm. Blandt de 25 Forsøgsrækker for Annexbryggeriets Ledninger fandtes de ligeledes kun i 2, og Middeltallet af Forsøgsrækkerne var 0.02 Vegetationer pr. ccm.

Bakterier. Hvad disse Organismer angaar, fandtes blandt 50 Forsøgsrækker fra Laboratoriets Ledninger 41, i hvilke de ikke optraadte. I Resten varierede Antallet for 1.8—0.1 Vegetationer pr. ccm. ,og Middeltallet for alle Forsøgsrækkerne var 0.08 Vegetationer pr. ccm. Kun i 3 af de 25 Forsøgsrækker fra Hovedbryggeriets Ledninger optraadte der Bakterieinfektion; Antallet af

---

[1]) Naar vi ville spørge om Grunden til den stærke Udvikling af Skimmel (og Bakterier), som har fundet Sted i Kolberne med Urt og Øl, der bleve inficerede med Vand fra Hovedbryggeriet i Sammenligning med den, som fandtes ved Infektion af ovennævnte Vædsker med Vandet fra Annexbryggeriet, maa vi søge Grunden i den Omstændighed, at Hovedbryggeriets Vandbeholdere findes i Nærheden af Korn- og Maltmagasinerne. I disse findes der som bekjendt, f. Ex. paa Bygkornenes Overflade, en betydelig Mængde Skimmelsporer (og Bakterier), som ved Rensningen og Kastningen af Kornet føres omkring med de forskjellige Luftstrømninger og let kunne havne i de i Nærheden opstillede Vandbeholdere. For Annexbryggeriets Vedkommende er dette Forhold derimod ikke tilstede. Forskjellen sees iøvrigt tydeligst, naar man betragter Tabellerne I og II Side. 134. Dette er et smukt Exempel paa hvorledes man gjennem de videnskabelige Forsøg kan erholde Resultater for Praxis, og det giver os et Vink om, hvorledes man i forekommende Tilfælde helst bør forholde sig, naar Talen er om Anbringelse af Vandbeholdere i et Bryggeri.

Vegetationer varierede fra 0.4—0.1 pr. ccm., og Middeltallet af Forsøgsrækkerne var 0.03 Vegetationer pr. ccm. Af de 25 Forsøgsrækker fra Annexbryggeriets Ledninger fandtes de kun i 1 i et Antal af 0.8 Vegetationer pr. ccm. Middeltal af Forsøgsrækkerne var 0.03 Vegetationer pr. ccm.

Af ovenstaaende Resultater faa vi to Spørgsmaal besvarede, nemlig dels i hvor stor Mængde (Antal af Veget. pr. ccm., se Tab. I) de forskjellige Mikroorganismer optræde, og dels, hvor hyppigt (i hvor mange af Forsøgsrækkerne; se Tab. II) de findes. For lettere Oversigts Skyld har jeg samlet disse to Resultater i nedenstaaende to Tabeller, hvis Sammensætning iøvrigt let vil forstaas.

**Tabel I.** (Antal af Vegetationer pr. ccm.)

| | Laboratoriet. | | Hovedbryggeriet. | | Annexbryggeriet. | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Urt. | Øl. | Urt. | Øl. | Urt. | Øl. |
| Bakterier......... | 2.9 | 0.08 | 1.2 | 0.03 | 0.9 | 0.03 |
| Skimmel......... | 2.4 | 0.7 | 3.1 | 1.0 | 1.3 | 0.3 |
| Gjærlignende Celler | 0.4 | 0.09 | 0.4 | 0.01 | 0.3 | 0.02 |

**Tabel II.**

| | Laboratoriet. | | Hovedbryggeriet. | | Annexbryggeriet. | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Urt. | Øl. | Urt. | Øl. | Urt. | Øl. |
| Bakterier......... | 68 % | 18 % | 68 % | 12 % | 56 % | 4 % |
| Skimmel......... | 86 % | 84 % | 96 % | 100 % | 64 % | 44 % |
| Gjærlignende Celler | 34 % | 24 % | 28 % | 8 % | 32 % | 8 % |

Naar vi i Korthed ville rekapitulere, hvad der er fremkommet ved disse Undersøgelser, bliver det følgende: Skimmelsvampene ere de Organismer, der hyppigst udvikle sig saavel i Urt som i Øl; de optræde næsten i alle Forsøgsrækkerne fra Laboratoriets og Hovedbryggeriets Ledninger (84—100 %), meget sjældnere derimod i Forsøgsrækkerne fra Annexbryggeriets Ledninger (44—64 %). Ogsaa med Hensyn til Antal af Vegetationer ere de dominerende, dog maa herfra undtages Forsøgsrækkerne fra Laboratoriets Ledninger, der udmærke sig ved en stor Rigdom paa Urtbakterier. Bakterierne ere dernæst — for Urtens Vedkommende — dem, der hyppigst ud-

vikle sig i denne; noget over Halvdelen af Forsøgsrækkerne (56—68 %) indeholdt disse Mikroorganismer. Anvendes derimod Øl, optræde de kun sjældent (4—18 %). Antallet af Vegetationer er, naar det ovenfor nævnte Resultat fra Forsøgsrækkerne med Vand fra Laboratoriets Ledninger undtages, ogsaa mindre end Antallet af Skimmelvegetationer. Sjældent optræde ogsaa de gjærlignende Celler, særlig naar Øl benyttes som Næringsvædske; en Undtagelse gjøre dog Forsøgsrækkerne med Laboratoriets Ledningsvand (24 %); naar derimod Urt benyttes, optræde de hyppigere i Forsøgsrækkerne (28—34 %). Antallet af Vegetationer er det mindste i Forhold til de andre omtalte Mikroorganismer.

B. Findes der Bakterier, ægte Saccharomyceter og andre Gjærceller og overhovedet nogle af de for Urt og Øl skadelige Arter blandt disse Organismer?

Vi komme nu til Spørgsmaalet om, hvorvidt nogle af de Former, som have særlig Krav paa Interesse, ere fundne i Analyserne, og særlig da til det Spørgsmaal: Optræder der ægte Saccharomyceter (Bryggerigjær eller vild Gjær) eller ej? Svaret herpaa lyder benægtende. Det er aldrig lykkedes mig blandt de gjærlignende Celler at finde andre Former end Torula-Arter (deriblandt ogsaa røde Former) og Mycoderma cerevisiae; Gjæringsfænomener i Urten frembragte de fundne Former aldrig. Af de saa hyppigt optrædende Skimmelsvampe var der heller ingen, som frembragte Gjæring i Urt; Penicillium glaucum er her som overalt en hyppig Gjæst; at ogsaa Mucor stolonifer eller Former, som staa den nær, hyppigt findes i Vandanalyser, har jeg ligeledes havt Lejlighed til at iagttage. Blandt Bakterieformerne optraadte en Tidlang ikke sjældent en, som forvandlede hele Urtmængden i Kolben til en meget sejg, traadtrækkende Masse. Saadanne Arter ere beskrevne af H. van Laer under Navnet Bacillus viscosus I og II i hans Afhandling: »Note sur les fermentations visqueuses« (Mémoires couronnés et autres mémoires publiés par l'académie royale de Belgique. Tome XLIII. Bruxelles. 1889). I enkelte Analyser fandtes i Ølkolber Bact. aceti og Bact. Pasteurianum Hansen. Sarcinaformer bleve ikke fundne af mig, men at de kunne forekomme er sikkert; ifølge velvillig mundtlig Meddelelse af A. Jørgensen ere de fundne i de paa hans Laboratorium hyppigt udførte Vandanalyser. Naar Urten var inficeret med Bakterier, var den stundom kun opaliserende, uden særlig fremtrædende ejendommelig Lugt, stundom mere eller mindre affarvet og ofte tillige forsynet med Hindedannelse; den havde da en ejendommelig og

og som oftest ubehagelig enten syrlig eller sødlig vammel Lugt (»Selleriegeruch«. A. Zeidler: »Beiträge zur Kenntnis einiger in Würze und Bier vorkommenden Bakterien«. Wochenschrift f. Brauerei Nr. 47, Berlin, 1890). Stundom var den, som ovenfor bemærket, traadtrækkende. Hyppigst optraadte den affarvede Urt med vammel, sødlig Lugt og Hindedannelse. Spørgsmaalet om, hvorvidt Coccus-Former optraadte, og hvor hyppigt de i saa Tilfælde vare tilstede i Analyserne, kunde maaske være af nogen Vigtighed med Hensyn til Afgjørelsen af, hvorvidt og i hvor høj Grad en Infektion fra Luftens Kim havde fundet Sted. Kokkerne optræde nemlig ifølge en Angivelse hos Miquel (der anføres i Kredslæge H. A. Nielsens Doktordisputats: »Om Bakterierne i Drikkevand med særligt Hensyn til Formerne i Kjøbenhavns Ledningsvand«, S. 4., Kbhvn., 1890) i størst Procentantal af Luftens Kim, idet ca. 60 % af disse ere Kokker, 25 % Baciller og 15 % Bakterier, og en Optræden af dem i større Mængde i Vandet plejer man at tyde som en stærk Infektion af dette fra Luften. At Kokker ofte forekomme i Urtkolberne, har jeg ganske vist bemærket, men en Undersøgelse af, hvor hyppigt dette sker, har jeg ikke foretaget, idet jeg i det hele ikke har villet indlade mig paa den vistnok saa temmelig endeløse Opgave at bestemme Bakterierne nærmere; det vilde kræve en hel Række saavel kemisk-fysiologiske som rent botaniske Undersøgelser, hvis Resultat næppe vilde svare til den Tid og det Arbejde, som disse Prøver forlange.

C. Forskjellige Faktorers Indflydelse paa Vandvegetationernes Udvikling.

Vi komme nu til nogle af de Faktorer, som have Indflydelse paa Mængden af de optrædende Kim, og skulle da navnlig dvæle ved Spørgsmaalet om Temperaturens Indflydelse.

Optræde de i Vandet værende og i Urt og Øl udviklingsdygtige Mikroorganismer i lige stort Antal i Aarets forskjellige Perioder, eller findes der Tider, paa hvilke de ere tilstede i særligt stort Antal, og hvilke ere da disse?

Fra de talrige bakteriologiske Undersøgelser af Vand i hygiejnisk Øjemed vide vi, at Antallet af Kim i det samme Vand langtfra altid er det samme. Miquel bemærker i sit ovenfor citerede Værk over Vandanalyser Pag. 130, at det samme Vand kan til Aarets forskjellige Tider bedømt fra et hygiejnisk Standpunkt faa Benævnelsen »meget rent«, »rent« eller »middelmaadigt«, og det ligger da nær at antage, at det samme maa gjælde, naar Talen er om Analyser til zymoteknisk Brug. De talrige Undersøgelser af Luftens Mikroorganismer have lært os, at saavel den forskjellige

Temperatur som ogsaa den større eller mindre Fugtighedsgrad spiller en stor Rolle med Hensyn til Hyppigheden af disses Forekomst, og at saaledes Antallet af disse tiltager og aftager med den stigende eller faldende Temperatur; medens Fugtigheden begunstiger Udbredelsen af Skimmelsporer, findes det største Bakterieantal i Luftens Støv derimod i den tørre Tid. Dette Resultat har ogsaa vist sig, naar Undersøgelserne anstilles med Urt og Øl som Næringsvædsker altsaa naar Talen er om zymotekniske Luftundersøgelser (E. Chr. Hansen: »Undersøgelser over de Organismer, som til forskjellige Tider af Aaret findes i Luften i og omkring Carlsberg, og som kunne udvikle sig i Ølurt«. Medd. fra Carlsberg Laboratoriet, Bd. I, Hefte 2, S. 185, 1879 og Hefte 4, S. 381, 1882). Man kunde derfor være fristet til at antage, at lignende Forhold for Temperaturens Vedkommende vilde gjøre sig gjældende, naar Talen er om Vandets Kim. Bakteriologisk-hygiejniske Vandundersøgelser have imidlertid vist, at saavel paa Overfladevandet (Søer og Floder) som paa Grundvandet (Brønde) har Temperaturens Til- og Aftagen ingen tilsvarende Indflydelse paa Antallet af de deri forekommende Bakterier. Ifølge Undersøgelser af Wolffhügel (Mitth. aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte. Bd. I, Berlin, 1881) over Vandet i Spree og Tegelersee fandtes det største Udslag for Bakterier i Oktober og Marts, og ikke i Sommermaanederne, og Miquel (ovenfor citerede Værk P. 132) meddeler om Seinevandet, at det indeholder det mindste Antal Kim i Sommermaanederne, det største i Efteraars- og derefter i Vinter- og Foraarsmaanederne. Nielsen skriver i sin ovenfor nævnte Doktordisputats P. 132: »Hverken Nedbør eller Temperatur synes at øve nogen Indflydelse paa Kimenes Antal og ej heller paa Formerne«. Miquel derimod mener i det ovenfor citerede Værk P. 134 o. flg., at Nedbøren spiller en stor Rolle, idet Antallet af Bakterier i Vandet stiger med Regnmængden. Hvad endelig Bakterierne i Jorden angaar, have Undersøgelser af Jordoverfladen af Fraenkel (Zeitschr. für Hygiene, Bd. II og Bd. VI) givet som Resultat, at nogen Indflydelse af Aarstiderne paa Kimenes Mængde ikke kunde paavises.

Det viste sig da ogsaa ved mine Undersøgelser, dels at Antallet af Kim langtfra var det samme til forskjellige Tider i det samme Vand, og dels at der — som man ogsaa kunde vente — ikke indtraf nogen regelmæssig Til- og Aftagen af de paagjældende Organismer efter Aarstiderne.

Naar Temperaturen ikke har nogen Indflydelse paa Overfladevand, er det rimeligt, at den heller ikke vil have det paa Vandet i Brønde, som hele Aaret igjennem have en temmelig konstant

Temperatur. Men, kunde man indvende, Prøverne her ere ikke tagne fra selve Brøndene, men fra Ledningerne, og Vandet opholder sig dog en Tidlang i disse og i Beholderne, inden det benyttes, og her kan jo Temperaturen stige (desuden kan Vandet blive urent, hvis Ledninger og Beholdere ikke ere i Orden). Da der imidlertid paa de omtalte Bryggerier stadig forbruges store Vandmængder, vil Vandets Temperatur ikke faa Lejlighed til at stige kjendeligt. En Stigen af Temperaturen her vil ogsaa spille en ganske anden Rolle end ude i Naturen, hvor saa mange andre store Faktorer faa Lov til at gribe ind. Jeg vil i Forbigaaende bemærke, at Temperaturen som oftest var 8—9° R. i Ledninger og Beholdere.

Det er altsaa andre Faktorer, som have bevirket Svingningerne paa Aarets forskjellige Tider, ja selv paa de efter hinanden følgende Dage, og hertil høre sandsynligvis den forskjellige Nedbør, Tilførsel af Overfladevand, Berøring med den atmosfæriske Luft og desuden for nogle Analysers Vedkommende abnorme Forhold ved Brønden (paa Grund af Arbejder ved disse) eller ved Beholdere, hvilke to sidste Forhold f. Ex bevirkede et større Udslag for Mikroorganismer i længere Tid i Analyserne fra Laboratoriets Ledninger, medens Berøringen med den atmosfæriske Luft var Aarsagen til den stærke Skimmeludvikling i de Kolber, der bleve inficerede med Vand fra Hovedbryggeriets Ledninger.

Jeg skal først berøre Forholdet for de samlede Kim, Bakterier, Skimmelsvampe og gjærlignende Celler, dernæst betragte Forholdet for hver enkelt af de nævnte Grupper af Mikroorganismer og deraf søge at uddrage nogle Slutninger, for saa vidt det lader sig gjøre af det til dette Øjemed dog temmelig utilstrækkelige Materiale.

Ved at gjennemgaa de forskjellige Forsøgsrækker kom jeg til det Resultat, at der havde fundet idelige Svingninger Sted, og at det næppe vilde være muligt at afgjøre, i hvilke Aarstider der fandt den største, og i hvilke der fandt den mindste Udvikling Sted; ofte var det Foraars- og Efteraarsmaanederne, der viste det største Antal Kim, stundom indtraadte dette i Sommertiden; men vi maa ogsaa erindre, at Forsøgene her behandle de samlede Kim, og i den Tid, i hvilken Vandet plejer at være fattigst paa Bakterier, optræde f. Ex. Skimmelsvampene i stor Mængde, og mange af disse udvikle sig med stor Lethed i Urt, hvad der derimod ikke gjælder for Bakterierne.

Jeg undersøgte ogsaa, hvorledes Forholdet stillede sig for hver enkelt af de omtalte Grupper, og fandt for Bakteriernes Vedkommende følgende Resultat. Store Svingninger forekom ikke, et

Maximum indtraf i Januar og September, et Minimum i Juli og December, dog vare Analyserne her netop meget faa. Naar Analyserne for Januar, som kun skyldes Undersøgelser fra Laboratoriets Ledninger, undtages, var Forskjellen i de forskjellige Maaneder af Aarene kun ringe, men i Januar vare Forholdene netop meget abnorme paa Grund af de ofte omtalte Arbejder ved Brønden, der forsyner disse Ledninger; disse Arbejder fortsattes ganske vist i længere Tid, men for de andre Maaneders Vedkommende traadte da Analyserne fra de to Bryggerier til, hvorved Forskjellen udjævnedes. I det hele blev Resultatet af de forskjellige Analyser, at Antallet af Bakterier, der kunne udvikle sig i Urt og Øl, er omtrent det samme hele Aaret rundt.

Skimmelsvampene gave følgende Resultat. Her optraadte et Maximum i Maanederne Juli, August og September; i de andre Maaneder varierede Tallene ikke meget, dog vare de særlig lave i Vintermaanederne Oktober—December.

Hvad endelig de gjærlignende Celler angaar, fandt jeg følgende. Ogsaa her vare Svingningerne ikke store, og saavel i Vinter- og Foraarsmaanederne som i Sommer- og Efteraarsmaanederne fandtes baade Maxima og Minima vexlende med hinanden.

D. Forsøgenes Betydning for Praxis.

Ovenstaaende Undersøgelser have vist os, hvilke af Vandets Organismer der kunne optræde i Urt og Øl og gjøre Skade, samt i hvor stort Antal disse Former i Almindelighed optræde, og hvor hyppigt de kunne findes i Analyserne. Deres Antal er ganske vist ikke stort under normale Forhold, men kan, som nogle af mine Forsøgsrækker udvise, stige betydeligt. Det gjælder i sidstnævnte Tilfælde at søge efter Aarsagerne.

Grundvandet er som bekjendt i en vis Dybde kimfrit, men det naar i denne rene Tilstand sjældent til det Sted, hvor vi skulle udnytte det, idet der paa Vejen tilføres Kim, dels fra Overfladevand, dels fra Luften; en Vandanalyse bliver derfor ofte tildels ogsaa en Luftanalyse. De Bakteriekim, som ere tilførte Vandet, dels fra Jordbundens øverste Lag, og dels fra selve Luften, ville ganske vist under Konkurrencen med de specifike Vandbakterier gaa til Grunde, og en Optræden af en større Mængde Bakterier i en Brønd foraarsaget ved f. Ex. Boring eller Gravning vil som Følge herat efterhaanden forsvinde, naar Aarsagen dertil hører op. Saaledes stillede Forholdet sig netop ved den Brønd, som forsyner Laboratoriet og tildels Hovedbryggeriet med Vand. Der blev i denne paa Grund af utilstrækkelig Vandmængde foretaget forskjellige Arbejder, der varede

det meste af Sommeren, hele Efteraaret og Vinteren 1888 og først tilendebragtes i Begyndelsen af 1889. Under disse Arbejder og nogen Tid derefter var Vandet i zymoteknisk Henseende slet, særlig optraadte Urtbakterier i stor Mængde. Efterhaanden tabte imidlertid dette store Antal af Bakterier sig, og der var nu Grund til at antage, at vi kun havde at gjøre med de for dette Vand ejendommelige Kim, hvis vel at mærke Ledninger og Beholdere vare i Orden. Her vil jeg imidlertid bemærke, at det omtalte Vand ogsaa, førend Arbejdet i Brønden tog sin Begyndelse, havde været slet, men Aarsagen hertil laa i forskjellige Ulemper ved Beholderen, som imidlertid bleve rettede. Disse bestod dels i, at der herskede en stærk Varme i Rummet, hvor Beholderen stod, hidrørende fra Maskiner, som befandt sig i umiddelbar Nærhed, dels i en Tilstrømning af Spildedamp gjennem Beholderens Afløbsrør, idet dette udmundede i en Spildedampsledning. Herved blev Trælaaget over Beholderen fugtigt og varmt og som Følge deraf et Arnested for Mikroorganismer. Det er altsaa af Vigtighed for Praxis ved Analyser af denne Art at have sin Opmærksomhed henvendt paa Brønden og dens Forsyning, hvorvidt Overfladevandet har Tilgang eller ikke, og paa Ledninger og Beholdere. En hyppig og grundig Rensning af disse maa naturligvis finde Sted; mine Forsøg vise dog ikke direkte, at en saadan giver sig tilkjende ved et formindsket Antal af Mikroorganismer i Analyserne — stundom tiltog endog Antallet af disse efter en saadan Rensning — idet andre tilfældige Omstændigheder udefra kunne virke ind. At imidlertid en ofte gjentaget grundig Rensning er gavnlig er naturligvis udenfor al Tvivl. Forsøgsrækkerne fra Hovedbryggeriet med den store Rigdom paa Skimmelvegetationer og Bakterier i Sammenligning med den fra Annexbryggeriet give os et Fingerpeg om, at det ikke er ligegyldigt, hvor Vandbeholderne anbringes. Dette Forhold er omtalt udførligt S. 133, Anm. Ligeledes kan jeg her henvise til de uheldige Forhold ved Laboratoriets Vandbeholder, som ere omtalte ovenfor.

Hvis derfor Vandet, som benyttes, er Grundvand, frit for Tilflyden af Overfladevand, og hvis Brønde, Ledninger samt Beholdere ere i Orden og hyppig renses grundigt, vil Udslaget saavel for Bakterier som for de andre Mikroorganismer baade i Urt og Øl være ringe; jeg skal i saa Henseende vise hen til Resultaterne af mine Analyser fra Annexbryggeriets Ledninger; Vandet herfra kan nemlig gjælde for et Mønster paa godt Vand til Bryggeribrug.

Naar vi nu ville se lidt nærmere paa, hvad der forøvrigt foruden de ovenstaaende Bemærkninger kan udledes af Forsøgene af

Betydning for den store Praxis, for Bryggeri-Industrien, maa vi betragte Resultatet i Relation til de tre store Processer Maltningen, Brygningen og Gjæringen. Er der paa noget af disse tre Punkter Fare for en Indgriben i Driften fra Bryggerivandets Side? Hvad først Maltningen angaar, da stiller Spørgsmaalet om Mikroorganismernes Tilstedeværelse i Støbvandet sig jo saaledes, at disse næppe ville komme til at spille nogen Rolle her, da Bygkornene selv medføre utallige Kim, naar de i Støbkarrene komme i Berøring med Vandet og, som Hansen bemærker, »et Mere eller Mindre, som almindeligt Vand kan bringe med sig, vil derfor i dette Tilfælde næppe kunne have nogen Betydning«.

Senere hen under Brygningsprocessen dræbes disse Organismer ved Urtens Kogning, og der kunde i det højeste være Tale om, hvorvidt de under Mæskningen ved den lave Temperatur af ca. $30^0$ R. kunde faa nogen Betydning, saaledes som det er angivet af H. Vogel i en Afhandling i Allg. Zeitschr. für Bierbrauerei. Nr. 40, Wien, 1889. Forsøg, som jeg anstillede i den Retning, gave dog ingen Oplysning desangaaende; der fandtes nemlig baade før og efter denne Mæskning utallige Bakterier, som kom til Udvikling i sød Urt, der anvendtes til disse Forsøg. I Gjærings- og Lagerkjældere vil Faren derimod være tilstede, dog svækkes særlig for den førstes Vedkommende Betydningen noget paa Grund af Konkurrencen med den i store Mængder tilstedeværende Gjær og for den sidstes Vedkommende ved den yderst lave Temperatur, som her hersker.

For den praktiske Bedømmelse af Vandet har det en særlig Betydning, hvorvidt de Mikroorganismer og i særlig Grad de Bakterier, som ved en Vandanalyse udsaas i Urt- og Ølkolberne, optræde tidligere eller senere i disse. Det er nemlig klart, at de Organismer, som først optræde f. Ex. paa den 4de eller 5te Dag efter Forsøgets Begyndelse, maa i den Grad have været svækkede, at de under Bryggeriforhold enten meget vanskeligt eller slet ikke vilde være komne til Udvikling. Organismerne ere nemlig ved Laboratorieforsøgene i flere Henseender gunstigere stillede end i Driften; dels kunne de udvikle sig uden Konkurrence med Gjæren, dels er den Temperatur, for hvilken de ere udsatte, for de flestes Vedkommende en Optimumstemperatur. At anstille Forsøgene i Kolber under Konkurrence med Gjær og ved en lavere Temperatur, saaledes som det er foreslaaet af Prior (Bayr. Brauer Journal Nr. 7. 1891), vil ikke have nogen Betydning, da disse Forhold alligevel ikke ville svare nærmere til Forholdene i Praxis end den af mig anvendte Fremgangsmaade; en Gjæring i smaa Kolber med steri-

liseret Urt er naturligvis ikke det samme som en Gjæring i Gjæringskjælderens store Kar og den derefter følgende Lagring paa Fadene.

Uagtet Skimmelformerne ere de hyppigst forekommende og sædvanlig ogsaa dem, som ere tilstede i størst Antal ved Urtanalyserne, er deres Betydning dog vistnok kun ringe; som bemærket udvikle de sig ogsaa langsomt. Vi finde i det færdige Øl stundom deres Sporer, men, saavidt jeg veed, aldrig et Mycelium.

Bakterierne, som i Analyserne med Urt som Næringsvædske optraadte i fra 56—68 % af de anstillede Forsøgsrækker, og som angribe Urten i høj Grad, affarve den, give den en højst ubehagelig Lugt o. s v., disse Bakterier bringes under Udvandingen af Gjæren i Berøring med denne og føres med den over i Gjærkarrene, hvor de kunne udvikle sig videre. En Del gaa med Øllet over i Lagerkjælderen, andre forblive i Bundgjæren og føres med den ny Paasætningsgjær atter over i Urten, hvor deres Tilstedeværelse, navnlig eftersom deres Antal forøges, vil kunne have en overordentlig skadelig Virkning. I Lagerkjælderen vil Faren for en videre Udvikling derimod ikke være saa stor paa Grund af den lave Temperatur; men naar det med Sygdomsbakterier befængte Øl aftappes og saaledes bliver udsat for Luftning og højere Temperatur, tager Sygdommen ofte til med rivende Fart, saa at Øllet efter kort Tids Forløb bliver aldeles usælgeligt.

Sarcinaformer, som ifølge P. Lindner (Die Sarcinaformen der Gährungs-Gewerbe) kunne virke skadeligt paa Øl, men ogsaa kunne være aldeles uskadelige (A. Petersen: »Sarcina im Biere ohne irgend welche Krankheitsphänomen«. Zeitschr. f. das ges. Brauwesen Nr. 1, 1890 og A. Jørgensen: »Sarcina«. Allg. Brauer und Hopfen Zeitung Nr. 115, 1890), har jeg ikke fundet i mine Vandanalyser (de ere dog ifølge velvillig mundtlig Meddelelse fra A. Jørgensen fundne, som ovenfor bemærket, i nogle af de i hans Laboratorium foretagne Vandanalyser). En Form, som gjorde Urten slimet, traadtrækkende (B. viscosus) fandt jeg en Tidlang meget ofte i Urtkolberne (se ovenfor); den har imidlertid aldrig vist sig i Driften og har altsaa ikke kunnet udholde Konkurrencen med Gjæren eller ikke kunnet udvikle sig ved den lave Temperatur.

For at Zymoteknikeren skal kunne give en Bedømmelse af et Bryggerivand, maa han have en Maalestok, hvorefter han kan rette sig; den Maalestok, der staar til hans Raadighed, yder, saaledes som vi have set, meget større Sikkerhed end den, Hygiejnikeren kan anvende. For Nemheds Skyld kan man foretage en

Udsæd af 1 Draabe Vand i hver Kolbe i Stedet for at udsaa $^{1}/_{8}$ ccm. af Vandet i Urt og $^{1}/_{2}$ ccm. i Øl, ogsaa kan man lade sig nøje med Udsæd i Urt alene. Hvis man til sin Prøve anvender f. Ex. 25 Flasker, vil man ialt udsaa ca. 1 ccm. af Vandprøven. Det Resultat, som har Interesse for Bryggeren, er imidlertid ikke dette, hvormange Organismer — særlig Bakterier — der findes pr. ccm., en saadan Angivelse forstaar han i mange Tilfælde slet ikke, men derimod, hvorvidt Vandet i zymoteknisk Henseende er godt eller slet; her er det altsaa, at Maalestokken behøves. En saadan give mine her meddelte Forsøg fra de to Bryggeriers og fra Laboratoriets Ledninger og Beholdere. Annexbryggeriets Vand maa betegnes som godt, Hovedbryggeriets som endnu brugbart og Laboratoriets som slet i zymoteknisk Henseende. Hansen kom ved sin Analyse i 1888 til et andet Resultat, idet Vandet fra Laboratoriets Ledninger den Gang gav et ringe Udslag for Urtbakterier. En anden Maalestok er angivet af Schwackhöfer i hans ovenfor citerede Afhandling; den falder dog tildels sammen med den af mig angivne. Schwackhöfer anvender til sine Forsøg 25 Freudenreichskolber og udsaar en Draabe af Vandprøven i hver, ved at multiplicere Antallet af inficerede Flasker med 4 faar han Resultatet udtrykt i Procent, og han grupperer nu efter sine Resultater Analyserne paa følgende Maade: Til 1ste Gruppe, Vand, som er særlig godt til Bryggeribrug, regner han de Tilfælde, i hvilke hverken Urt eller Øl gav Udslag for Mikroorganismer; til 2den Gruppe, godt Vand, regner han de Tilfælde, i hvilke Urten gav Udvikling i højest 10 % af de benyttede Kolber og Øllet ingen Organismer indeholdt; til 3die Gruppe, Vand, som endnu er brugbart, de Tilfælde, i hvilke af Urtkolberne højest 50 %, af Ølkolberne ingen endnu vare blevne inficerede; til 4de Gruppe, Vand, som kun i Nødstilfælde kan benyttes, de Tilfælde, i hvilke et større Procentantal end 50 % af Urtkolberne inficeredes, medens Ølkolberne viste ingen eller højest 19 % inficerede Kolber, og endelig til 5te Gruppe, Vand, som er uanvendeligt til Bryggeribrug, regner han de Tilfælde, i hvilke Procentantallet baade for Urt og for Øl er højere end i 4de Gruppe angivet.

Han tager dog tillige ved Bedømmelsen Hensyn til Vandets kemiske Beskaffenhed, hvad der naturligvis ogsaa er af Vigtighed.

Jeg har endelig ogsaa behandlet det Spørgsmaal, hvorvidt en Filtration af Vandet vilde have nogen Betydning, ad experimental Vej. Jeg skal kort omtale disse Forsøg og de deraf fremkomne Resultater.

Et Filter, som theoretisk set giver et aldeles fyldestgjørende Resultat, er Chamberlands Filter, idet det virkelig kan præstere aldeles kimfrit Vand, naar Filterrørene ere i fuldstændig Orden, men da det i Praxis ikke saa godt kan anvendes, fordi det kræver megen Forsigtighed ved Behandlingen paa Grund af Lerrørenes Skørhed, og fordi disse ofte maa renses og prøves med Hensyn til Tæthed, da fine Revner i dem paa anden Maade ikke kunne opdages — valgte jeg ikke dette Filter af oven nævnte Grunde. Derimod benyttede jeg et af de saakaldte Kuntzeske Husholdningsfiltre (Kulfiltre), gjennem hvilke Filtrationen sker meget hurtigt, hvilket jo ogsaa er af Betydning for Praxis. Forsøgene anstilledes saaledes, at der til hvert toges to Prøver af det samme Vand, nemlig dels før og dels efter at det havde passeret Filtret. Fra disse to Vandprøver foretoges Udsæd dels i Urt og dels i Øl efter Hansens Methode, saaledes at der udsaaedes $^1/_8$ ccm. Vand i hver Urtkolbe og $^1/_2$ ccm. i hver Ølkolbe; desuden anstilledes tillige Forsøg med Udsæd i Næringsgelatiner (Urtgelatine og Kjødvandspeptongelatine) efter Kochs Methode. Disse Forsøg give en dobbelt Oplysning, nemlig dels med Hensyn til Filtrationen, hvorvidt denne har havt nogen Betydning med Hensyn til en Aftagen af Kimenes Antal overhovedet, dels ogsaa fordi den giver os Lejlighed til at anstille en Sammenligning mellem Hansens og Kochs Fremgangsmaade og til at vise Fejlene ved denne sidste, hvis den anvendes til zymoteknisk Brug.

Resultatet af mine Forsøg var, at det filtrerede Vand som Regel gav en langt større Udvikling baade i Urt og Øl og i Næringsgelatinerne end det samme Vand før Filtrationen. Det vil altsaa sige, at Vandet under sin Vandring gjennem Filtret aflejrer en Mængde Bakterier, som her have Lejlighed til at formere sig stærkt og gjøre det Vand urent, som senere passerer derigjennem. Kun 1 af de 4 Filtre, jeg arbejdede med, gav stadig et, særlig for Urtens og Øllets Vedkommende, ganske fortrinligt Resultat, men dette var desværre en Undtagelse. En Anvendelse i Bryggeripraxis af Kuntzes Filtre, saaledes som de i Almindelighed findes i Handelen, vil følgelig ikke være at anbefale.

Gelatinemethoden viste atter her baade med det filtrerede og med det ufiltrerede Vand et umaadeligt højt Antal af Vegetationer imod Vegetationerne i Urt og Øl, tillige viste den ikke altid Udslag for de samme Organismer, som kom frem ved Kulturerne i disse Vædsker; Methoden er derfor ubrugelig ved zymotekniske Undersøgelser. Derimod maa den paa Grund af det store Udslag,

som den giver, foretrækkes til Forsøg, hvor det drejer sig om at prøve Filtres Godhed.

Jeg skal her endnu anføre nogle faa af disse ovenfor omtalte Forsøg:

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| I. | Peptongel. | gav ca. | 8000 | Kolonier | pr. ccm. | for største Delen Bakterier. |
| | Urtgel. | — | 14 | — | — | Skimmelformer. |
| | Urt | — | 5.4 | — | — | Bakt. og Skml. |
| | Øl | — | 0.8 | — | — | Skimmel. |
| II. | Peptongel. | — | 350 | — | — | Bakterier. |
| | Urtgel. | — | 8 | — | — | Skimmel. |
| | Urt | — | 5.3 | — | — | Bakt. og Skml. |
| | Øl | — | 0.8 | — | — | Skimmel. |
| III. | Peptongel. | — | 370 | — | — | Bakterier. |
| | Urtgel. | — | 4 | — | — | Bakterier. |
| | Urt | — | 1.1 | — | — | Skml. og Torula. |
| | Øl | — | 0.4 | — | — | Skimmel. |

I sidste Forsøg optraadte altsaa ganske andre Former i Urt og Øl end i Næringsgelatinerne.

---

## III. Oversigt.

Naar jeg i Korthed skal give en Oversigt over Hovedindholdet af denne Afhandling, bliver dette følgende. Udgangspunktet for mit Arbejde ere Hansens Undersøgelser over, hvilken Fremgangsmaade man bør anvende ved den biologiske Analyse af Vandet i Bryggerier. Han fremhævede som bekjendt, at man hertil maa benytte Urten og Øllet selv og ikke Gelatinemethoden. Skjøndt hans Opfattelse synes at være af sig selv indlysende, mødte den dog, navnlig strax efter dens Fremkomst, megen Modstand. De Prøver, jeg har anstillet i denne Retning, kunne derfor næppe siges at være overflødige. De have bragt det samme Resultat, som det, hvortil Hansen kom, og jeg har derfor i det væsentlige fulgt den af ham foreslaaede Methode.

Efter først at have prøvet Fremgangsmaaden har jeg dernæst undersøgt Spørgsmaalet om de Tidsgrændser, indenfor hvilke der i de inficerede Kolber optræder en for det blotte Øje synlig Vegetation. Jeg kom til det Resultat, at ihvorvel en saadan kan op-

træde senere end det 7de Døgn, maa det dog anses for fastslaaet, at Udviklingen af Vegetationerne i de fleste Tilfælde er afsluttet til den Tid, og at Analyserne for Praxis' Vedkommende kunne afsluttes paa dette Tidtpunkt. Jo senere nemlig disse Vegetationer opstaa i Laboratorieforsøgene, desto ringere Betydning ville de faa for Praxis, da Udsigterne, til at en Udvikling under Bryggeriforhold kan finde Sted, ere betydelig mindre, dels paa Grund af den lave Temperatur, som findes under disse Forhold og dels paa Grund af Konkurrencen med den i Urten tilstedeværende kraftige Gjærvegetation. Ligeledes har jeg paa dette Sted omtalt, at det til Forsøgene er tilstrækkeligt kun at anvende Urt, fordi alle de Organismer, som kom til Udvikling i Øl, ogsaa kunne udvikle sig i førstnævnte Næringsvædske. Endelig har jeg vist, hvilke fejlagtige Resultater man vil komme til, hvis man ved disse Undersøgelser anvender Kochs Gelatinemethode i Stedet for, som Hansen har angivet, Urt og Øl. Til at prøve et Filters Godhed er Gelatinemethoden derimod fortrinlig.

I Afhandlingens andet Afsnit har jeg beskrevet mine Analyser og de Resultater, som de bragte. Det viste sig, at Skimmelformerne vare de Organismer, som hyppigst kom til Udvikling i Urt og Øl, og at de som Regel ogsaa vare de fremherskende med Hensyn til Antallet af Vegetationer i de enkelte Forsøgsrækker. Næst efter dem vare Bakterierne de hyppigst optrædende, naar Urt benyttedes som Prøvevædske; i Øl derimod udviklede de sig kun sjældent. Antallet af de Bakterie-Vegetationer, som hver enkelt Forsøgsrække gav, var som Regel ogsaa mindre end Skimmelformernes. Sjældnest fandtes de gjærlignende Celler, og det Antal af Vegetationer, hvormed de optraadte, var ogsaa det mindste i Forhold til de andre nævnte Organismers.

I mine Forsøgsrækker iagttoges aldrig Saccharomyceter, af gjærlignende Celler derimod Torulaformer og Mycoderma cerevisiae; blandt Skimmelformerne fandt jeg Penicillium glaucum og Mucor stolonifer og af Bakterier Eddikesyrebakterier (B. aceti og B. Pasteurianum) og en Form, som gjorde Urten slimet og traadtrækkende (B. viscosus), samt meget hyppigt Arter, som gave Urten en ubehagelig, vammel Lugt. Sarcina optraadte ikke, men at den kan findes i saadanne Vandprøver, fremgaar af de Analyser, der ere foretagne i A. Jørgensens Laboratorium.

Antallet af Mikroorganismer, som udviklede sig i Urt og Øl, var ikke det samme til Aarets forskjellige Tider i det samme

Vand, men der iagttoges heller ikke nogen regelmæssig Til- eller Aftagen af de paagjældende Former efter Aarstiderne. Den forskjellige Nedbør, Tilførslen af Overfladevand, Berøring med den atmosfæriske Luft foruden abnorme Forhold ved Brønde, Ledninger og Beholdere vare sandsynligvis de Faktorer, som bevirkede, at Kimenes Antal vexlede. Hvad Antallet af de samlede Kim — Bakterier, Torulaformer og Skimmelsvampe — angaar, viste det sig, at der fandt idelige Svingninger Sted, og at det var umuligt at afgjøre, i hvilke Aarstider der fandtes den største, og i hvilke der fandtes den mindste Udvikling; naar jeg betragtede Forholdet med Hensyn til hver enkelt Gruppe for sig, fandt jeg for Bakteriernes Vedkommende, at Antallet af disse var omtrent det samme hele Aaret rundt, medens Skimmelformerne optraadte med et Maximum i Juli, August og September og med et Minimum i Vintermaanederne Oktober til December. Hvad endelig de gjærlignende Celler angaar, fandtes saavel i Vinter- og Foraarsmaanederne som i Sommer- og Efteraarsmaanederne baade Maxima og Minima vexlende med hinanden.

Under Omtalen af Forsøgenes Betydning for Praxis fandt jeg blandt andet Lejlighed til at fremhæve, hvorledes den Omstændighed, at Vandbeholderne i Gamle Carlsbergs Hovedbryggeri vare anbragte i Nærheden af Korn- og Maltmagasinerne, havde faaet en væsentlig Indflydelse paa de fra dette Bryggeri foretagne Analyser, idet der nemlig i disse optraadte en betydelig større Mængde Skimmelvegetationer end i de fra Laboratoriets og Annexbryggeriets Vandbeholdere foretagne. Det er altsaa ikke uden Betydning for et Bryggeri, hvor disse Beholdere anbringes. Lige overfor de tre store Processer Maltningen, Brygningen og Gjæringen fremhævede jeg, at det egentlig kun er under denne sidste, at de i Vandet værende og i Urt og Øl udviklingsdygtige Kim kunne komme til at spille nogen betydelig Rolle. Trods Skimmelformernes Hyppighed er deres Betydning dog en ringere; særlig farlige ere Bakterierne og navnlig i Gjæringskjælderen, medens de som Regel ikke kunne udvikle sig synderligt i Øllet i Lagerkjælderen paa Grund af dettes Rigdom paa Kulsyre og Alkohol samt paa Grund af den der herskende lave Temperatur; men naar Øllet aftappes og derved luftes, og naar det i Flaskerne og i de smaa Foustager udsættes for en højere Temperatur, kunne disse Mikroorganismer udvikle sig med rivende Hurtighed og foraarsage stor Skade.

Det er vigtigt for Zymoteknikeren, som skal foretage saadanne Analyser, at have en Maalestok med Hensyn til Bedømmelsen af

Vandets Godhed til Bryggeribrug. En saadan har jeg ment at kunne udlede af mine Forsøgsrækker henholdsvis fra Laboratoriets, Hovedbryggeriets og Annexbryggeriets Vand (se Tabel I, S. 134). Jeg har opstillet Vandet fra det sidstnævnte Bryggeri som et Mønster paa godt Vand, Vandet fra Hovedbryggeriet som endnu brugbart og Vandet fra Laboratoriet som slet. For dette sidstes, som ogsaa tildels for Hovedbryggeriets, Vedkommende skal jeg dog her minde om de uheldige ydre Forhold, navnlig de omfattende Arbejder, som bleve foretagne ved Brønden paa den Tid, da jeg udførte mine Analyser; heri maa aabenbart Grunden søges til det usædvanlig store Udslag af Vegetationer, særlig af Bakterier. De af Hansen i sin Tid foretagne Analyser af Vand fra den samme Brønd og de samme Beholdere bleve foretagne under gunstigere Omstændigheder og gave ogsaa et bedre Resultat.

Til Slutning har jeg behandlet det Spørgsmaal, hvorvidt en Filtration af Vandet mulig vilde være heldig, og i den Anledning foretaget Forsøg med Kuntzes Vandfiltre, fordi disse vistnok hyppigst anvendes og vel ogsaa ere heldigere at benytte i Praxis end Chamberlands, skjøndt disse, naar de ere i Orden, kunne give aldeles kimfrit Vand. Resultatet var imidlertid, at det filtrerede Vand som Regel gav en langt større Udvikling saavel i Urt og Øl som i Næringsgelatiner end det samme Vand før Filtrationen.

Jeg skal her endnu kun gjøre opmærksom paa, at mit foreliggende Arbejde ifølge sin Hovedopgave, som er den at give Analyserne af forskjelligt Vand, paa den ene Side er forskjellig fra og paa den anden slutter sig til og supplerer Hansens, hvis Opgave var den at undersøge Principerne for den Slags Undersøgelser.

# Undersøgelser fra Gjæringsindustriens Praxis.

(Bidrag til Mikroorganismernes Livshistorie.)

Af

Emil Chr. Hansen.

## V.

## Om den gjæringstekniske Analyse af Luftens og Vandets Mikroorganismer.

---

Et af de første større Arbejder, som jeg kastede mig over, da jeg begyndte mine Studier over Mikroorganismerne, var »Undersøgelser over de Organismer, som til forskjellige Tider af Aaret findes i Luften i og omkring Carlsberg, og som kunne udvikle sig i Ølurt«. (Nærværende Tidsskrifts I Bd., 2det Hefte, 1879, og 4de Hefte, 1882).

Som Titelen angiver, indeholde disse Undersøgelser Oplysning om de Arter af Luftens Mikroorganismer, der kunne danne Vegetationer i Urt, og om deres Optræden til Aarets forskjellige Tider saavel inde i Bryggeri-Lokalerne som i det Frie. Spørgsmaalet om disse Væseners Arnested blev skjænket en særlig Opmærksomhed. Theoretiske og rent praktiske Studier ere i dette ligesom i flere af mine andre Arbejder nøje knyttede sammen. Iblandt de theoretiske indtage Undersøgelserne over Alkoholgjærsvampenes Kredsløb i Naturen en fremtrædende Plads, men de derved vundne Resultater have paa den anden Side ogsaa en praktisk Interesse, navnlig for Ølfabrikationen, idet de bringe Oplysning om den større eller mindre Fare for Infektion, der er tilstede efter Aarstiderne og under forskjellige Forhold. Til de Dele af Afhandlingerne, som hovedsagelig have praktisk Interesse,

høre Undersøgelserne over de Mikroorganismer, som findes i Masken og i Luften i forskjellige Bryggeri-Lokaliteter.

Som bekjendt indeholder Masken talrige Bakterier, der fremkalde sure Gjæringer, som give sig tilkjende ved Lugten. Ifald disse Bakterier kunde føres op i Luften med de opstigende Dampe, vilde Masken i Bryggerigaarden være meget farlig. Det er derfor naturligt, at man altid har betragtet disse Dampe med en vis Mistillid. De Forsøg, jeg ifølge Hr. Brygger Kogsbølles Opfordring anstillede, viste imidlertid, at Dampene ikke føre Bakterier med sig. Hvis Masken derimod udtørres saaledes, at den med Vinden kan sende Støvskyer op i Luften, bliver den i høj Grad farlig. I Almindelighed ligger den dog i saa kort Tid, at den gjennem hele sin Masse bestandig vedbliver at være fugtig. Faren indtræder altsaa først, naar Hovedmassen er taget bort, og smaa Rester som tynde Lag ere blevne tilbage i Gaarden. Fejes disse ikke omhyggelig op, saa kunne de give Anledning til Bakteriesygdomme[1]).

Af praktisk Interesse ere ogsaa de Forskjelligheder, som Analyserne af Luften til samme Tid paa forskjellige Punkter af Bryggeriet Gamle Carlsberg viste. Den reneste Luft fandtes i Gjæringskjælderen. Dette skyldes ikke blot den strænge Orden, som der hersker, men i en endnu højere Grad den Omstændighed, at Kjælderen ved Hjælp af en Ismaskine forsynes med kold Luft, som ovenikjøbet underkastes en særegen Rensning i et med Klornatrium mættet Regnbad. Luften i Gjæringskjælderen paa Gamle Carlsberg indeholdt i Gjennemsnit i en Kub.-Centim. 0,0006 Kim; altsaa 1 Kim i 1591 Kub.-Centim. Jeg opfører disse Talstørrelser, fordi

[1]) Jeg kan her ikke undlade at gjøre opmærksom paa den store Fare, som de Apparater føre med sig, der i de senere Aar, navnlig i Tydskland, ere blevne opstillede i flere Bryggerier for at tørre Masken. I de Tilfælde, hvor jeg havde Lejlighed til at undersøge den paa denne Maade tørrede Mask, viste det sig nemlig, at Mikroorganismerne deri slet ikke vare dræbte, navnlig gjaldt dette om Bakterierne. Hvis Bryggerne med mere Opmærksomhed, end det er sket, havde studeret mine foran berørte Undersøgelser over Maskens Forhold i Bryggerigaarden, saa vilde de sikkert have havt større Betænkelighed, end det nu ofte er Tilfældet, ved at anbringe det nævnte Tørringsapparat saaledes, at Svalebakker og Gjæringskjælder daglig kunne blive inficerede med det bakterierige Støv, som gaar ud derfra. Ved at tørre Masken bringer man den netop i den Tilstand, i hvilken den bliver meget farlig for Driften. Alt dette burde Bryggeren tage med i Betragtning, naar han opstiller sin Beregning, om han skal anskaffe sig et Mask-Tørringsapparat eller ej.

jeg antager, at de ville kunne tjene som en Maalestok ved saadanne Analyser, i det Mindste indtil man faar en bedre.

Ved at foretage lignende Analyser i andre Bryggeriers Gjæringskjældere, hvor ingen Luftrensning fandt Sted, var Forskjellen meget fremtrædende, ikke sjældent indeholdt Luften her over fire Gange saa mange Kim som i den foran nævnte Kjælder. Hyppig iagttoges ogsaa her Bakterier, hvoriblandt Sarcina, samt Arter af vild Gjær, der i mine senere Undersøgelser viste sig at være Sygdomsformer. Ved disse Studier opstod for første Gang hos mig den Ide, at nogle af Øllets almindeligste og farligste Sygdomme ikke skyldes Bakterier, men visse Saccharomyceter, og de bleve saaledes Udgangspunktet for mine Arbejder i den Retning.

Forsøgene have naturligvis kun absolut Gyldighed for de Steder, paa hvilke de bleve anstillede, og kun for de Forhold, som da fandtes der. I det Store ville de dog ogsaa passe for andre lignende Egne og for andre Bryggerier. Skjøndt de bleve udførte i Aarene 1878—80, ere de endnu de mest omfattende, som vi have paa dette Omraade, og de deri fremsatte Resultater have intet mistet af deres Gyldighed. Ogsaa angaaende den af mig i disse gamle Forsøg benyttede Teknik maa det fremdeles siges, at den i Principet er rigtig. Den eneste Indvending, som paa vort nuværende Standpunkt kan rejses derimod, er, at man nu kan naa det Samme paa en bekvemmere Maade. Skulde jeg i Øjeblikket udføre saadanne Undersøgelser over Luftens Mikroorganismer, vilde jeg anvende en lignende Fremgangsmaade som den, jeg beskriver i det næste Afsnit om Analysen af Vandet.

.Som ovenfor bemærket høre disse Undersøgelser med til den Række af mine Skrifter, der behandle Opgaver fra Gjæringsindustriens Praxis. De skandinaviske Læsere, som ønske at gjøre sig nærmere bekjendte dermed, tillader jeg mig at henvise til mine foran citerede danske Afhandlinger.

I de senere Aar have flere Zymoteknikere anstillet lignende Undersøgelser, navnlig P. Lindner i Berlin, Will i München, Grønlund og Alfr. Jørgensen i Kjøbenhavn.

Da det nu er saa let at erholde videnskabelig Hjælp, vil man i større, vel indrettede Bryggerier herefter næppe forsømme af og til at lade foretage Analyser af Luften; man vil derved faa større Klarhed over Driftens Gang og undertiden tillige være i Stand til at forebygge Uheld. Det er navnlig Tilstanden i Gjæringskjælderen, som i den Henseende har Betydning for os.

En særlig Interesse faa saadanne Analyser, naar man anvender Apparater til Luftens Rensning, som det allerede for flere Aar

siden er sket paa Gamle og Ny Carlsberg. I den nyere Tid er det navnlig Lindes Ismaskiner og Kjølerør, som i dette Øjemed ere blevne indførte i talrige Bryggerier. Hvis man ikke vil gaa i Blinde, maa man naturligvis undersøge, hvad man opnaar derved. Analyser over Virkningen af Lindes Kjølerør i den nævnte Retning foreligge dog, saa vidt jeg ved, endnu ikke, men de vilde være meget ønskelige; jeg har derfor ogsaa i mine Forelæsninger flere Gange gjort opmærksom derpaa og griber her atter Lejligheden dertil.

---

Alle ere enige om, at den biologiske Undersøgelse af Vandet i Bryggerierne maa foretages efter de samme Principer som Undersøgelsen af Luften. Ogsaa synes det at følge af sig selv, at man ved de Dyrkningsforsøg, som de nævnte Undersøgelser kræve, benytter netop de Vædsker, hvormed der arbejdes i Bryggerierne. Om dette sidste Punkt hersker der dog ikke fuldstændig Enighed. Navnlig i Slutningen af Firserne var der flere af de ledende Bakteriologer, som slet ikke havde dette Syn paa Sagen. Der blev den Gang allevegne foretaget et stort Antal Undersøgelser over Vandets Indhold af Mikroorganismer efter Kochs Gelatinemethode, ikke blot i de hygiejniske, men ogsaa i de gjæringstekniske Laboratorier. I et større Arbejde, som Hueppe i 1887 udgav om saadanne Analyser, fremhæver han, at denne Methode er den vigtigste, naar det gjælder Løsningen af praktiske Opgaver, saavel i Tekniken som i Hygiejnen. For ham var der i den Henseende ingen Forskjel; Gelatinen skulde i alle Tilfælde anvendes.

Dette stod strax for mig som en stor Vildfarelse, og efter at have udført de nødvendige Forsøg i den Retning, tog jeg til Gjenmæle derimod i en lille Afhandling, som i Begyndelsen af 1888 udkom i «Zymoteknisk Tidsskrift» og i «Zeitschrift für das ges. Brauwesen». Jeg opnaaede vel herved, at Hueppe, saavel som nogle andre af Gelatinemethodens ensidige Talsmænd, forandrede deres Opfattelse paa dette Punkt, men imidlertid var man i de fleste gjæringstekniske Laboratorier bleven saa vant til udelukkende at arbejde efter Kochs hygiejniske Fremgangsmaade, at det var meget vanskeligt at fremkalde en Forandring i den Henseende. Min nævnte Afhandling blev læst med Opmærksomhed; Velvillighed mødte den, som jeg maatte vente, ikke. Ogsaa Hueppe kunde ikke tilbageholde sin Vrede imod den, uagtet han i Grunden anerkjendte, at jeg har Ret. Mærkværdigt nok blev mit Arbejde af de fleste tydske Bakteriologer opfattet som et Angreb

paa Kochs Methode, hvad det dog slet ikke er; det er kun en Paamindelse om ikke at gjøre Misbrug af den.

Da jeg under mit Besøg i London i 1889 holdt et Foredrag derom i »The Laboratory Club«, mødte jeg ligeledes der fra flere Sider Modstand i den Anledning. Ogsaa i England havde man nemlig i Aarenes Løb vænnet sig til at arbejde efter den hygiejniske Fremgangsmaade, uden først at undersøge, om man virkelig ad den Vej kunde faa de Spørgsmaal besvarede, som Bryggeridriften stiller. Jeg har med Forsæt ikke igjen villet gaa nærmere ind paa disse Stridigheder, thi de have ikke længere tilstrækkelig Interesse dertil. I de sidste Par Aar have tilmed flere og flere Laboratorier i de forskjellige Lande sluttet sig til mig. Det er nu min Hensigt paa dette Sted at give en Bearbejdelse af mine ovenfor berørte Afhandlinger, og hermed haaber jeg at kunne afslutte disse Arbejder.

Den af Koch angivne Methode til den bakteriologiske Analyse af Drikkevand bestaar deri, at man blander 1 Kub.-Centim. af Vandet med 10 Kub.-Centim. Næringsgelatine (Kjødvands-Pepton-Gelatine), der er gjort flydende ved 30° C. Denne Blanding hældes ud paa en Plade og beskyttes mod fremmed Infektion ved en fugtig Klokke. Undertiden benytter man kun ½ Kub.-Centim. eller kun en Draabe af Vandet. Pladerne opbevares ved Stuetemperatur og undersøges efter 3—4 Dage. Af praktiske Grunde beregner man Antallet af udviklede Vegetationspletter for 1 Kub.-Centim. af det undersøgte Vand.

Naar en Brygger ønsker en bakteriologisk Analyse af det Vand, han vil anvende i sin Fabrik, saa drejer det sig ikke om at udfinde, hvilke og hvormange Mikroorganismer, der overhovedet findes deri, heller ikke hvilke Vegetationer, der udvikle sig i Gelatine eller paa en anden fast Næringsbund med eller uden Kjødvands-Pepton, det har Altsammen her ingen Interesse, thi Fabriken arbejder hverken med den ene eller den anden af disse Substanser. Det simple Spørgsmaal, der stilles os, er derimod dette: Hvorledes forholder Vandet sig til Urten og til Øllet; i hvilken Grad er det rigt paa saadanne Mikroorganismer, der kunne udvikle sig i disse Næringsvædsker, og gives der blandt dem saadanne Arter, der kunne fremkalde farlige Forstyrrelser i Driften? Vor Analyse maa kort sagt saa vidt muligt være udført under de i Bryggeriet herskende Forhold; vi maa altsaa fremfor Alt arbejde med selve de to nævnte Vædsker. Ogsaa for Hygiejnikeren var det ønskeligt at kunne experimentere direkte; men han kan ikke anstille sin

Prøve med det menneskelige Legeme selv og maa derfor nøjes med kunstige Næringsstoffer. Hvad jeg her har bemærket, er saa indlysende, at jeg egentlig undrer mig over, at det er nødvendigt at gjøre opmærksom derpaa.

Resultaterne af denne gjæringstekniske Methode ville, som man let kan forudse, ikke falde sammen med Resultaterne af den ovenfor berørte hygiejniske; Sammenstillingerne i det Følgende ville klart vise dette. Idet Gjæringsfysiologien og Gjæringsteknikeu have deres særlige, fra den medicinske Bakteriologi forskjellige Opgaver, maa de ogsaa udarbejde deres egne Methoder.[1])

Ledet af de ovenfor nævnte Synspunkter, anstillede jeg de følgende Forsøg.

Næringsvædskerne, Øllet og Urten, bleve hver for sig fyldte i smaa Kolber med Bomuldsprop. Chamberlandkolben, som jeg har afbildet i en tidligere Afhandling, eller endnu bedre dennes Cylinderform (sædvanlig kaldet den Freudenreichske Kolbe) er navnlig at anbefale. Jeg anvendte saadanne Kolber af 22 Kub.-Centim. Indhold og satte til hver omtrent 10 Kub.-Centim. af Vædsken. Et større Antal af disse blev paa een Gang steriliseret under Tryk i et Dampkogeapparat. Denne Fremgangsmaade er særlig at anbefale for Øllet, der som bekjendt er vanskeligt at sterilisere, uden at der fremkaldes stærke Forandringer; det gjælder, som fremhævet, at nærme sig saa meget som muligt til Forholdene i Driften. Maaske kunde man faa endnu bedre Ølpræparater, naar Sterilisationen blev udført ved Hjælp af et Filter (f. Ex. Chamberlands Lerrør) og med saadanne Forsigtighedsregler, at hverken Alkohol eller Kulsyre kunde undvige; men Arbejdet vilde herved blive betydelig vanskeligere. Urten kan man selvfølgelig ogsaa sterilisere ved simpel Kogning.

Af det sædvanlige Koldledningsvand paa Gamle Carlsberg blev i September 1887 5 Kub.-Centim. blandede med 5 Kub.-Centim. af Næringsvædsken (i den ene Række Øl, i den anden Urt). Derefter bleve 15 Kolber med Øl og 15 Kolber med Urt inficerede hver med en Draabe (0,04 Kub.-Centim.) af den tilsvarende Blanding i de to nævnte Kolber. Draabeudsæden kan man udføre ved Hjælp af en Pipette. Den øvre Ende af denne forbindes med en Gummislange, hvori der anbringes Bomuld, for at den under

[1]) Ordet Methode er her taget i den samme Betydning, som det har faaet i den nyere fysiologiske og kemiske Literatur; der betegnes herved Arbejdsmaader, tekniske Indretninger og Kunstgreb og ikke nye Forskningsretninger.

Afdrypningen indstrømmende Luft kan være fuldstændig kimfri; efter at det Hele er steriliseret, fastgjøres det paa passende Maade i et Stativ. Ved Hjælp af en Klemhane regulerer man Udstrømningen. Ved alle disse Arbejder er den af mig tidligere beskrevne Kasse at anbefale. Det følger af sig selv, at alle Apparaterne saavelsom Næringsvædskerne maa være steriliserede, og at man maa drage Omsorg for altid at arbejde med Gjennemsnitsprøver. Det til Udsæd i Kolberne anvendte Kvantum Vand bliver hver Gang nøje afmaalt, saa at man kan omregne Resultatet for 1 Kub.-Centim.

Af den samme Vandprøve blev der til samme Tid taget $^1/_2$ Kub.-Centim. til Analyse efter Kochs Fremgangsmaade og ligeledes $^1/_2$ Kub.-Centim. til en lignende Pladekultur, men hvor der istedetfor Kjødvands-Pepton-Gelatine blev brugt Urt-Gelatine (Urt med ca. 5 % Gelatine). Desuden blev der paa stivnede Gelatineplader uden Næringsvædske udsaaet et stort Antal Draaber af de ovennævnte Blandinger af Vand med Urt og Vand med Øl. Alle disse Gelatinekulturer bleve holdte fugtige og bedækkede med Glasklokker og ligesom Kulturerne i Kolberne anbragte i en Thermostat ved 24—25° C.

Hensigten med dette Forsøg var først og fremmest at faa nøjagtig Oplysning om, hvorledes Kulturerne i Øllet og i Urten vilde forholde sig i Sammenligning med Gelatinekulturerne, og da af de indhentede Resultater at bestemme, hvilken Fremgangsmaade der var bedst at anvende ved Bryggerianalyser. De sidstnævnte Gelatinekulturer bleve anvendte, fordi jeg ønskede at prøve, om det ikke paa den ene eller anden Maade var muligt, ogsaa ved denne Analyse at anvende Gelatine. Det er nemlig ofte lettere, især for den mindre Øvede, at arbejde med Kulturer i Gelatine end i Vædsker.

Resultatet af den beskrevne Forsøgsrække var følgende: Efter omtrent tre Dage vare begge Kolberne med Blandingerne af 5 Kub.-Centim. Vand med 5 Kub.-Centim. Urt og 5 Kub.-Centim. Vand med 5 Kub.-Centim. Øl uklare; de indeholdt en meget kraftig Bakterievegetation og som underordnet Indblanding nogle gjærlignende Celler (Pasteurs saakaldte Torula).

Efter 3—4 Dage indeholdt flere af de paa den rene Gelatine anbragte Draaber makroskopisk kjendelige Vegetationer; saadanne fandtes nu ogsaa i Kochs Gelatine og i Urtgelatinen.

Efter 4—5 Dage indeholdt alle de paa den rene Gelatine udsaaede Draaber af Øl- og Urtblandingerne tydelige Vegetationer; kun i 2 Draaber fandtes de ovennævnte gjæragtige Celler, i 3 Draaber Skimmelsvampe (Penicillium glaucum og Cladosporium), i

disse 5 Draaber desuden Bakterier; alle øvrige Draaber indeholdt kun Bakterier. I de fleste Tilfælde havde disse Vegetationer gjort Gelatinen flydende.

Forsøget blev afbrudt efter 14 Dages Forløb. Ingen af Øl- eller Urtkolberne med den ringe Tilsætning af Vand indeholdt paa denne Tid endnu noget Spor af Vegetation.

I Kochs Gelatine fandtes 111 Vegetationspletter, hvilket Resultat, beregnet for 1 Kub.-Centim. Vand, giver 222; alle indeholdt Bakterier, kun faa af Vegetationerne havde gjort Gelatinen flydende.

Urt-Gelatinen viste 15 Vegetationer, altsaa i 1 Kub.-Centim. Vand 30.

Som et nyt Exempel anfører jeg Resultaterne af en anden Forsøgsrække, anstillet ganske paa samme Maade som den første. Vandprøven blev tagen 3 Dage efter den første.

Forløbet var omtrent det samme, kun var paa fjerde Dag en Urtkolbe angreben af Bakterier og paa femte Dag en anden Urtkolbe af Penicillium glaucum.

Efter 15 Dage vare de øvrige 13 Urtkolber klare, uden Spor af Vegetation, og det samme var Tilfældet med alle 15 Ølkolber.

Tallet af Vegetationerne i Urtkolberne var følgelig 6,6, beregnet for 1 Kub.-Centim.; Tallet i Kjødvands-Pepton-Gelatinen var 1000 og i Urt-Gelatinen 34, ligeledes beregnet for 1 Kub.-Centim. af Vandet. Ligesom i den første Række udviklede alle de paa den rene Gelatine udsaaede Draaber Vegetationer. De iagttagne Mikroorganismer vare de samme som i den første Række.

Det samme Hovedresultat gave ogsaa nogle Analyser, der under min Vejledning bleve udførte i September, Oktober og November 1887 af Deltagerne i mine gjæringsfysiologiske Kursus, d'Hr. Karneeff fra Moskau, Kukla fra Prag, Terry fra Melbourne og Wichmann fra Wien.

Man ser af alle disse Forsøg, at den hygiejniske Methode bestandig gav et altfor højt Udslag, og at der er ligesaa Lidet at udrette med Urt-Gelatinekulturerne. Medens Kulturerne i Øl stadigt gave 0 og i Urt i de samtidige Rækker 0; 0; 6,6; 3; 9 Vegetationer for 1 Kub.-Centim. Vand, fandtes der, naar Kochs Næringsgelatine anvendtes, under de samme Forhold og i de samme Vandprøver 100; 222; 1000; 750, ja en Gang endogsaa 1500 i 1 Kub.-Centim. Vand.

At de sidstnævnte Tal maa betragtes som værdiløse for Bryggerianalysen, behøver ikke at fremhæves. Lidt bedre stiller Analysen sig, naar man i Stedet for Kjødvands-Pepton-Gelatine benytter Urt-Gelatine, dog ere ogsaa i dette Tilfælde Tallene altfor

høje, og de give os heller ikke nogen brugbar Oplysning. De allerfleste af de i Gelatinekulturerne udviklede Bakterier formerede sig hverken i Øllet eller i Urten og have følgelig ingen Betydning for vort Formaal.

For at kunne anstille en Sammenligning bleve alle Kulturerne i de ovenfor omtalte Forsøgsrækker henstillede ved den samme Temperatur, nemlig ved 24—25° C. Efter den hygiejniske Methode blive de imidlertid sædvanlig anstillede ved Værelsets Temperatur, og Undersøgelsen af dem foretages efter 3—4 Dage. Ogsaa naar jeg udførte mine Forsøg paa denne Maade, fik jeg dog bestandig altfor høje Resultater i Sammenligning med Kulturerne ved Hjælp af de to Næringsvædsker. Kochs Fremgangsmaade kan altsaa heller ikke anvendes i denne Form.

Dersom vi ved Hjælp af den hygiejniske Methode med nogenlunde Sikkerhed kunde bestemme, om der var Sygdoms-Bakterier i Bryggerivandet eller ikke, saa vilde vi selvfølgelig altid benytte den ved Siden af den anden; men dette er som bekjendt desværre endnu ikke Tilfældet, og den faar derfor for vort Øjemed i det højeste Betydning som et Middel til at kontrollere Filtrene.

Men ogsaa ved denne Prøve kommer det særlig an paa at udføre Analysen paa en saadan Maade, at de gjennem et længere Tidsrum og paa forskjellige Steder vundne Resultater virkelig kunne sammenlignes indbyrdes. I Lærebøgerne anbefales det at anvende Kochs Fremgangsmaade saaledes, at man lader Pladekulturerne staa 3—4 Dage ved Værelsets Temperatur. Hertil er for det Første at bemærke, at paa denne Tid som Regel kun en lille Del af den hele Bakteriemængde har givet en tydelig Udvikling, og tages denne procentvis, vil den ikke i alle Tilfælde være Udtrykket for den hele Bakteriemængde. Ønsker man at faa nøje Oplysning om et Vands virkelige Indhold af Bakterier, saa maa man fortsætte Kulturen mindst i 14 Dage. I en Analyse fandtes f. Ex. efter 4 Dage kun $^1/_{10}$ af det Antal af Vegetationer, som havde udviklet sig efter 10 Dage. og kun $^1/_{15}$ af dem, der vare tilstede efter 16 Dage. Desuden er Værelsets Temperatur en meget ubestemt og variabel Størrelse; det gjør f. Ex. en ikke ringe Forskjel, om Kulturerne staa ved 20 eller 10—5° C. Om Sommeren vil den samme Analyse kunne give et ganske andet Resultat, end hvis den blev udført om Vinteren. Naar man arbejder om Sommeren, og under forholdsvis gunstige Varmeforhold om Natten, vil den samme Vandprøve i samme Kultur give et tyde-

lig forskjelligt Resultat, eftersom Undersøgelsen af de udviklede Kolonier udføres efter 3 eller efter 4 Dages Forløb. Skal der altsaa foretages en Sammenligning, og derpaa løber jo det Hele ud, saa maa man tage disse Faktorer nøjere i Agt, end det hidtil sædvanlig er sket. En anden Vanskelighed ved Gelatinekulturerne bestaar deri, at Skimmelvegetationer i Forsøgets Begyndelse ikke sjeldent brede sig saaledes, at det bliver umuligt at gjennemføre Analysen.

Betragte vi de foregaaende Undersøgelser, saa se vi, at de ikke blot vise os den Vej, vi skulle gaa, naar det gjælder om paa en fornuftig Maade at udføre en Analyse af et Bryggerivand, men at de tillige give os Oplysning om mere almeninteressante biologiske Forhold. Vi lære saaledes, at der blandt de i de undersøgte Vandprøver talrigt tilstedeværende Bakterier kun fandtes yderst faa, som angrebe Urten og slet ingen, som angrebe Øllet.

Da enhver af de paa den rene Gelatine udsaaede Draaber, bestaaende af halv Vand og halv Næringsvædske, gav en kraftig Vegetation, saa kunne vi deraf med Sikkerhed slutte, at ogsaa alle Urt- og Ølkolberne, der bleve inficerede med ganske lignende Draaber, maa have modtaget livskraftige Kim. Ved direkte Undersøgelse blev det for de to ovenfor nærmere beskrevne Forsøgsrækker bestemt, at Udsæden i hver Kolbe endogsaa i flere Tilfælde indeholdt 60, hyppig 20 og aldrig mindre end 4 Bakterier; de fleste af disse Kim kom altsaa ikke til nogen Udvikling i de to Vædsker. Idet nogle af Urtkolberne udviklede Vegetationer, antager jeg, at nogle af det store Antal Organismer, der fandtes i Vandet, hørte til saadanne Arter, som kunne angribe Urten. Dette viste sig tydeligt i de Tilfælde, hvor en Urtkolbes Vegetation kun bestod af en eneste Bakterieart. Det maa under disse Omstændigheder antages, at de i Draabeudsæden sandsynligvis altid tilstedeværende almindelige Vand-Bakterier ere blevne undertrykte af de andre. Naar Spor af en saadan Renkultur indførtes i andre Urtkolber, saa fremkaldte de, som man kunde vente, ogsaa her hurtigt en Bakterieuklarhed; men Øllet blev aldrig angrebet af dem.

Saasnart derimod disse Vædsker bleve stærkt fortyndede, saa udviklede de udsaaede Mikroorganismer sig i Reglen meget kraftigt i dem. Saavel Blandingskolberne som Draabeudsæden paa Gelatinepladerne vise os allerede dette og endnu tydeligere de særlige Forsøg, jeg anstillede i denne Retning. Ikke blot Urten men ogsaa Øllet havde under disse Omstændigheder tabt den gamle Modstandsevne; men de ere i deres fortyndede Tilstand jo heller ikke mere,

hvad man i Bryggeriet forstaar ved Øl og Urt. At begge de nævnte Næringsvædsker, ogsaa naar de ikke ere fortyndede, let blive angrebne af visse Bakteriearter, er almindelig bekjendt. Ved Undersøgelsen af Kolberne maa man ikke glemme, at der gives Bakterier, der kunne udvikle sig i Urt og i Særdeleshed i Øl uden at fremkalde Uklarhed; hertil høre f. Ex. de af mig for nogle Aar siden beskrevne Eddikesyrebakterier.

For nærmere at studere Spørgsmaalet om de nævnte Vædskers Desinfektionskraft overfor Vandets Bakterier, anstillede jeg nogle særlige Undersøgelser. Af de bakterierige Blandingskolber blev der overført en Del i en anden Kolbe med steriliseret Vand. Dette blev herved ganske uklart. Af denne nye Blanding blev en Draabe indført i hver af en Række af de ovenfor beskrevne Øl- og Urtkolber. Efterat de vare blevne stærkt rystede og følgelig derved tillige luftede, bleve de henstillede ved 24—25° C.

Efter kort Tid var Vædsken i dem alle klar som før Udsæden, men efter to Dages Forløb vare næsten alle Urtkolberne ganske uklare af meget kraftigt udviklede Bakterievegetationer. Ølkolberne vare derimod endnu efter 16 Dage vedblivende klare uden Spor af nogensomhelst Vegetation, og dog havde som sagt enhver af dem ganske ligesom Urtkolberne modtaget i Hundredevis af livskraftige Bakterier.

Lignende Forsøg og med det samme Resultat bleve anstillede med Bakterier, der hidrørte fra Draabeudsæden paa Gelatine. Heraf fremgaar altsaa først den ret interessante Kjendsgjerning, at Vandets Bakterier, selv naar de bleve indførte i stor Mængde, ikke kunde udvikle sig i Øllet. Hvad nu angaar Urten, saa er jeg, naar jeg tager Hensyn til de ovenfor nævnte Resultater, tilbøjelig til den Opfattelse, at Infektionerne ikke fremkaldtes derved, at Vand-Bakterierne vare tilstede i stor Mængde, men derimod derved, at der var nogle af de Arter tilstede, som have den særlige Evne at kunne angribe den nævnte Vædske i ufortyndet Tilstand; vi ville kalde disse Arter for Urt-Bakterier.

Støttende mig til disse Iagttagelser anvendte jeg følgende Methode ved Analysen af Vandet paa Gamle Carlsberg:

Paa den foran beskrevne Maade blev der til hver af 15 Øl- og 15 Urt-Kolber sat 1 Draabe Vand (0,04 Kub.-Centim.) og til 10 Kolber af hver Sort 1/4 Kub.-Centim. Vand; derefter bleve Kolberne rystede og i 14 Dage henstillede ved 24—25° C. Øllet, som blev anbragt i disse Kolber, var undergjæret Lagerøl, og Urten af den Art, som benyttes i Bryggerierne til Fremstilling af saadant Øl (c. 14 % Ball.).

En Analyse, der blev udført efter denne Methode i November, viste, at 1 Kub.-Centim. af Vandet kun indeholdt 1,3 Urt-Bakterievegetationer og 1,3 Skimmelsvampevegetationer, altsaa 2,6 Vegetationer i det Hele. Andre Vegetationer traadte ikke frem, og Øllet blev slet ikke angrebet. Føre vi disse Resultater over paa de praktiske Forhold, saa ville vi altsaa i et saadant Tilfælde kunne føje 2½ Liter Vand til 1 Hektoliter Øl uden at fremkalde en Bakterievegetation.

I December 1887 gav 1 Kub.-Centim. Vand i en Pladekultur med Urt-Gelatine 38 Bakteriepletter, medens 2¼ Kub.-Centim. af den selvsamme Vandprøve, som fordeltes paa 9 af de foran omtalte Kolber med Urt, slet ingen Bakterieudvikling gav, men derimod 1 Skimmelvegetation. Forsøget blev anstillet paa samme Maade som de tidligere. Ligesom disse lærte altsaa ogsaa dette os, at de to Methoder give Resultater, som slet ikke stemme overens.

I de Tilfælde, hvor der blev anstillet en Prøve, viste det sig, at man kunde sætte 1 Kub.-Centim. Vand til 10 Kub.-Centim. af Øllet, uden at der fremkom anden Vegetation end Skimmelsvampe og Pasteurs saakaldte Torula, og ikke sjældent udeblev al Vegetation. Dette vil altsaa med andre Ord sige, at en Tilsætning af 1 Kub.-Centim. Vand til 10 Kub.-Centim. Øl ikke var tilstrækkelig til at ophæve Øllets Desinfektionskraft overfor de i Vandet værende Bakterier, thi ingen af disse kom til Udvikling i det saaledes fortyndede Øl.

Det maa selvfølgelig anbefales at udføre en mikroskopisk Undersøgelse af hver enkelt af de i Kolberne udviklede Vegetationer. I flere Tilfælde vil der tillige være Anledning til at foretage særegne Dyrkningsforsøg for at komme til Kundskab om, i hvilken Grad Arterne ere farlige.

Alle Prøverne have vist os, at Gelatinemethoden giver os meget højere Tal end den bryggeritekniske Methode, og dette gjælder saavel for Urt-Gelatine som for Kjødvands-Pepton-Gelatine. Vi have endvidere set, at der intet bestemt Forhold findes imellem de Tal, som vi erholde ved at anvende de to Methoder; derfor kunne vi ikke slutte noget fra den ene til den anden. Og hvad nu disse talrige Kolonier angaar, som udvikle sig i Gelatinekulturerne, saa staa vi her overfor den sørgelige Sandhed, at vi, selv om vi underkaste hver enkelt af dem en grundig mikroskopisk Undersøgelse, dog ikke ere i Stand til at afgjøre, om de indeholde Vegetationer, der formaa at angribe Urten og Øllet eller ej. For at faa dette Spørgsmaal besvaret,

og derpaa gaar Alt jo ud, maa vi foretage Dyrkningsforsøg i disse Vædsker selv.

En anden væsentlig Indvending mod at anvende Gelatiner er den, at nogle af de Mikroorganismer, som netop have den største praktiske Betydning for vor Analyse, ofte slet ikke udvikle sig deri. Dette gjælder f. Ex. om Eddikesyrebakterier, Saccharomyceter og andre Alkoholgjærsvampe. Ved direkte Forsøg med flere herhenhørende Arter har jeg erfaret, at de i den svækkede Tilstand, hvori de kunne forekomme i Luftens Støv, i Jorden og i Vandet, enten slet ikke udvikle sig i de foran omtalte Næringsgelatiner eller kun give en sparsom Vegetation deri, medens derimod lignende Celler fra de selvsamme Prøver gave en kraftig Udvikling, naar de bleve udsaaede i de beskrevne Kolber med Urt. Det Samme vil rimeligvis ogsaa gjælde om flere andre Arter end dem, der bleve prøvede.

Vi have ovenfor hørt, at 1 Kub.-Centim. af en Vandprøve i Kochs Pladekultur gav os 1500 Vegetationer, medens 1 Kub.-Centim. af den selvsamme Vandprøve næppe gav os en halv Snes, naar vi i Stedet for Gelatinen anvendte vore Kolber med Urt til Dyrkningen. Uagtet den bryggeritekniske Methode altsaa giver os forholdsvis meget smaa Talstørrelser, saa ere dog ogsaa disse for høje. Jeg skal nærmere begrunde dette.

De Bakterier, der f. Ex. udvikle sig i vore Kolber, blive her dyrkede hver for sig under særlig gunstige Forhold og unddragne Konkurrencens hæmmende Indflydelse; hvis vi havde indført dem i en Portion af den gjærende Urt fra Bryggeriets Gjæringskar, vilde en stor Mængde af dem være blevne undertrykte. I mine Forsøg med Torula og andre Arter af Alkoholgjærsvampe har jeg hyppigt havt Lejlighed til at erfare, at Arter, der, naar de vare ene til Stede i Urten, frembragte Øl af en meget ubehagelig Smag, desuagtet under de praktiske Forhold i den store Drift viste sig at være aldeles uskadelige, idet de nemlig i Konkurrencen med den gode Ølgjær bleve fuldstændig undertrykte. Da de erholdte Tal desuagtet ere smaa, har den Fejl, som vi begaa ved ogsaa at henregne de sidstomtalte Organismer til de skadelige, imidlertid mindre at sige. Dette gjælder i hvert Fald de Analyser, der ere omtalte i det Foregaaende. Noget nærmere de praktiske Forhold i Driften komme vi, naar vi foretage følgende Gruppering: De Kolber, hvori der kun udvikler sig Skimmelsvampe, udskilles for sig, thi de have kun Betydning for Maltgjøreriet. Jeg kjender i ethvert Fald intet Exempel paa, at Arter, henhørende til denne Afdeling af Mikroorganismerne, have fremkaldt Sygdomme i Øl.

De øvrige inficerede Kolber deles atter i to Grupper; til den ene henføre vi dem, i hvilke Vegetationen hurtig traadte frem; til den anden dem, i hvilke dette først skete efter flere Døgns Henstand (f. Ex. efter 5 Døgn og derover). Da Kimene i de sidstnævnte Kolber have udviklet sig saa langsomt, have vi al Grund til at mene, at de slet ikke vilde være komne til nogen Udvikling, hvis de fra Begyndelsen af vare blevne indførte i Gjæringskarrene eller i Lagerfadene. Det er da kun i den Gruppe af vore Kulturer, i hvilke Vegetationen hurtig traadte frem, at vi søge de for Øllet farlige Bakterier og vilde Gjærarter. Herved blive de fundne Tal endnu mindre, og vi nærme os, som sagt, endnu mere til de praktiske Forhold, som de virkelig findes i Bryggerierne. Det vilde naturligvis være Idealet helt at efterligne disse, men det lader sig ikke gjøre. Vi maa nøjes med at være komne dette Maal saa nært, som Tilfældet virkelig er. Spørgsmaalet om Konkurrencens Indvirkning stiller sig naturligvis ogsaa noget forskjelligt, ikke blot efter de forskjellige Fremgangsmaader, hvorefter Bryggerierne arbejde, men ogsaa efter den i Aarets Løb vexlende kemiske Sammensætning af Urten i det samme Bryggeri.

Uagtet alle disse Indskrænkninger giver dog den beskrevne Analyse os værdifulde Oplysninger og, som vi have hørt, af en saadan Art, som vi kun kunne opnaa ad den Vej. Vigtigt er det her at lægge Mærke til, at vi ved Dyrkningen i vore Kolber med Urt kunne erholde Vegetationer af alle de Mikroorganismer, om hvilke vi hidtil med Sikkerhed vide, at de fremkalde Sygdomme i Øl. Af disse Sygdoms-Mikroorganismer er der derimod flere, der slet ikke udvikle sig, hvis vi udsaa dem i Øllet selv. For at de skulle kunne give sig tilkjende og fremkalde Sygdoms-Fænomenerne, maa de indføres i den gjærende Urt. Af denne Grund faar følgelig Dyrkningen i Øllet mindre Betydning for vor Analyse, og Dyrkningen i Urten bliver absolut den vigtigste.

Naar vi anvende den beskrevne Methode med Omhu, ville vi altsaa derved være i Stand til at opdage de Fjender, der maatte være til Stede iblandt de mikroskopiske Væsener, som med Luften og Vandet føres ind i Fabrikken. Fejlen, som vi ere udsatte for at begaa, er, som flere Gange fremhævet, den at give de undersøgte Prøver af Luften og Vandet en lidt for daarlig Karakter.

Der er to Punkter i Bryggeriet, hvor koldt Vand efter en stor Maalestok bliver anvendt, uden at det dog kommer i direkte Berøring med Urten eller Øllet. Jeg tænker her paa Gjærballierne i Gjæringskjælderen og paa Støbevandet i Maltgjøreriet.

Det er en hyppig anvendt Fremgangsmaade at lade den udvaskede Gjær henstaa i Ballierne bedækket med koldt Vand. I nogle Bryggerier lægger man Isstykker direkte ned i Gjærmassen, i andre er man forsigtigere og anbringer Isen i Balliens Laag; under alle Omstændigheder sørger man for at tilvejebringe en lav Temperatur. Dersom dette ikke skete, saa vilde sandsynligvis ogsaa de fleste Arter af Vand-Bakterier danne kraftige Vegetationer i Gjærmassen. I Almindelighed staar Gjæren under de nævnte Forhold kun 12—24 Timer, sjældent 48 Timer. Naar den kommer i Ballien med det kolde Vand, holder den hele Masse c. 10° C., men efter at Laaget med Isen er anbragt, synker Temperaturen i nogle faa Timer ned til c. 6° C. Jeg har flere Gange og paa forskjellige Aarstider undersøgt en saadan Gjær, men aldrig fundet, at Bakterierne havde formeret sig i nogen i Øjne faldende Grad deri, naar der var bleven sørget tilstrækkeligt for Isafkjølingen. Og saasnart Gjæren indføres i Urten, standse, som vi ovenfor have lært, de fleste af Vandets Bakterier deres Virksomhed. Det vil altsaa ikke have noget at betyde, om saadanne Arter endog i temlig høj Grad formere sig i den Slimmasse, som findes mellem Gjærcellerne. Denne frembyder nemlig en gunstig Næringsbund for Udviklingen af de allerfleste Bakterier. At vi ogsaa paa dette Punkt i Driften frygte Formeringen af de Bakterier, som kunne gjøre os Skade, følger af sig selv. I det Foregaaende have vi kaldt disse sidstnævnte Arter med et fælles Navn for Urt-Bakterier. Findes der nogle af dem i det Vand, der kommer i Berøring med Gjæren, saa ville de i Reglen, ligesom Vand-Bakterierne, formere sig, navnlig hvis man har udsat Gjærmassen for en for høj Temperatur. Da Urt-Bakterierne imidlertid ikke synes at være hyppige i Vandet (dette gjaldt i det Mindste om de af mig undersøgte Prøver), saa bliver Faren paa dette Punkt under almindelige Bryggeriforhold vistnok ikke ret stor. I Reglen vil Gjæren selv fra den sidste Gjæring i Urten bringe nogle Urt-Bakterier med sig. Under den kraftige Alkoholgjæring i Gjæringskarrene kunne disse ikke komme til Udvikling, men dette vil derimod ske i Gjærballierne, saasnart man forsømmer Afkjølingen. Jeg er saaledes tilbøjelig til at mene, at Gjæren selv i Almindelighed fører større Farer med sig paa dette Punkt end Vandet. Sikkert er det i hvert Fald, at man ikke nøje nok kan vaage over, at Gjæren i de Mellemrum, i hvilke den ikke er i Virksomhed i Gjæringskarrene, har en lav Temperatur. Dette er her det Vigtigste. At sterilt Vand dog ogsaa er at foretrække til Udvaskning af Gjæren, behøver jeg næppe at fremhæve,

om jeg end, som bemærket, mener, at det i Almindelighed ikke er nødvendigt.

Jeg har heller ikke særlig taget Hensyn til Maltgjøreriet, og af den Grund, at dette efter min Mening vilde være overflødigt. Bygkornene have nemlig allerede paa deres Overflade en Rigdom af Bakterier og andre Mikroorganismer, førend de komme i Berøring med Støbevandet, og det Mere eller Mindre, som almindeligt Vand kan bringe med sig, vil derfor i dette Tilfælde næppe kunne have nogen Betydning. Forøvrigt er det jo ogsaa hovedsagelig Skimmelsvampene, der ere frygtede i Maltgjøreriet, og disse ville, hvis de findes i de undersøgte Vandprøver, ligeledes udvikle sig i de Øl- og Urtkolber, som vi anvende til Analysen.

Den bakteriologiske Vandanalyse befinder sig vel endnu stadig i sin Udvikling og har hidtil ikke kunnet opvise store praktiske Resultater, men det er uden Tvivl rigtigt ikke at forsømme den. Vi maa imidlertid ikke glemme, at det Resultat, som en Analyse af en enkelt Prøve giver os, kun er af meget betinget Værdi, thi vi erholde derved kun Oplysning om Vandet paa den Tid, da Prøven blev tagen. Beskaffenheden af et og samme Vand er dog underkastet store Svingninger efter Aarstiden, ja endog efter Dagens Timer; og hvor det, som i de fleste Bryggerier, oppumpes i store Beholdere, har det ogsaa stor Betydning, om man tager Prøven kort før eller efter Beholderens Rensning o. s. v. Dersom vi altsaa ønske at vide noget Nærmere om Beskaffenheden af et Vand, saa maa vi udføre en større Række af Analyser og i Løbet af et længere Tidsrum.

Mine gjæringstekniske Undersøgelser over Luftens og Vandets Mikroorganismer ere vel udførte med særligt Hensyn til de Forhold, der findes i Undergjærings-Bryggerierne, men i de store Træk ville Resultaterne ogsaa have deres Gyldighed for de Fabrikker, i hvilke Overgjæringen anvendes.

Siden jeg i 1887—89 offentliggjorde de foranstaaende Undersøgelser over Bryggerivand, er der i forskjellige Tidsskrifter fremkommen flere mindre Meddelelser, som gaa i den samme Retning. Der er vel heller ikke nu mere nogen Zymotekniker, som vil anbefale at anvende Kjødvands-Pepton-Gelatine til Analyser af Vand, naar det Spørgsmaal stilles, om det er godt til Bryggeribrug eller ej. Forsaavidt har mit foreliggende lille Arbejde altsaa ikke været forgjæves. Det har endvidere givet Anledning til, at Holm udarbejdede de i nærværende Hefte offentliggjorte »Biologiske og gjæringstekniske Analyser af Vand til Bryggeribrug«.

# VI.

# Nye Undersøgelser over Sygdomme i Øl, fremkaldte af Alkoholgjærsvampe.

(Anden Afhandling.)

## I. Indledning.

Min første Afhandling om det ovennævnte Emne blev offentliggjort i »Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet« II Bd. 2. Hefte 1883. Jeg havde da endnu ikke foretaget den af mig senere indførte Deling af mine Undersøgelser over Gjæringsorganismerne i to Rækker; derfor findes denne Afhandling iblandt »Undersøgelser over Alkoholgjærsvampenes Fysiologi og Morfologi«, skjøndt den efter sit Indhold nærmest hører ind i den nye Række, som jeg i 1888 har begyndt at udgive under Navn af »Undersøgelser fra Gjæringsindustriens Praxis«. I 1884 udgav jeg i »Zeitschrift für das ges. Brauwesen« en Meddelelse om nye Studier i den nævnte Retning. Disse Arbejder indeholde dog kun de Hovedresultater, som mine Experimenter for otte Aar siden havde bragt, og jeg lovede deri senere at ville give en udførligere Fremstilling deraf og da tillige at behandle Spørgsmaalets forskjellige Sider. Jeg har ogsaa siden den Tid med kortere eller længere Afbrydelser fortsat disse Undersøgelser, og i den Anledning anstillet over halvhundrede Forsøgsrækker. Idetmindste for Øjeblikket mener jeg at være kommen til en Afslutning dermed, og idet jeg nu udgiver det foreliggende Arbejde, har jeg bestræbt mig for deri at opfylde de i de to ovenfor nævnte foreløbige Meddelelser givne Løfter.

De af mine Undersøgelser, som have direkte Betydning for Gjæringsindustrien, samle sig om tre Hovedspørgsmaal: Spørgs-

maalet om Øllets Sygdomme, om Gjærens Rendyrkning og om Anvendelsen af planmæssig udvalgte Gjærarter eller Racer.

Det var den ved det første Spørgsmaals Behandling erholdte Løsning, som gav Anledning til, at jeg i disse praktiske Studier ogsaa optog de to andre Spørgsmaal. Hvis det nemlig havde vist sig, at Alkoholgjærsvampene ikke frembringe Sygdomme, saa vilde der næppe have været nogen tvingende Grund til at indføre virkelige Renkulturer i Industrien og altsaa ej heller til at foretage Udvalg af een bestemt Art eller Race.

Spørgsmaalet om Sygdomme i Øl og andre gjærede Vædsker har saaledes en stor Betydning. Løsningen er ej heller kommen paa een Gang; mange Forskere have i lange Tider arbejdet derpaa. Undersøgelserne paa dette Omraade staa i nøje Forbindelse med Forskningerne over Selvdannelse, hvis Resultat som bekjendt blev, at en ny experimental Videnskab opstod, nemlig Videnskaben om Mikroorganismerne. I denne indtager Læren om Sygdomme i gjærede Vædsker en ikke uanselig Plads. En Fremstilling af, hvorledes denne Lære efterhaanden har udviklet sig, maa derfor have Interesse saavel for Biologen som for den praktiske Zymotekniker. Dette gjælder dog naturligvis kun, forsaavidt en saadan Fremstilling hviler paa et grundigt Studium af Kilderne og paa en anskuelig Maade fører de skiftende Standpunkter frem for os, ikke løsrevne, men i deres indbyrdes Sammenhæng. I det følgende Kapitel har jeg gjort et Forsøg i den Retning. Det er første Gang, at dette Spørgsmaals Historie skrives.

---

## 2. Hvorledes Læren om Sygdomme i gjærede Vædsker efterhaanden har udviklet sig.

Det erindres, at vi, naar vi paa dette Sted tale om Sygdomme, da derved forstaa de uheldige Forandringer, som gjærede Vædsker, navnlig Øl og Vin, kunne undergaa som en Følge af Mikroorganismers Indgriben. I nøje Forbindelse med Undersøgelserne over Sygdomme i gjærede Vædsker staar det store Spørgsmaal om Selvdannelse (generatio æqvivoca). Ved Selvdannelse eller Urdannelse forstaa vi den Proces, at levende Væsener udvikle sig af den døde Natur, særlig af formløs organisk Masse, uden Æg, Frø eller Kim.

Der har til alle Tider været Naturforskere, som hyldede denne Opfattelse. I Aarene 1745—1756 fik den nyt Liv i de Skrifter, som Needham da udgav. Et af hans Forsøg bestod deri, at han

udsatte Kjødvandsextrakt i lukkede Kolber for en stærk Opvarmning. Da der nu alligevel udviklede sig Organismer deri, mente han, at disse maatte være fremkomne ved en Selvdannelse. Buffon og et stort Antal andre Lærde sluttede sig til hans Lære.

Der fremstod dog ogsaa Modstandere; den betydeligste blandt disse var Spallanzani. Han begyndte i 1765 at udgive Beretninger om en Række Forsøg, der gik imod Needhams Opfattelse. De Kolber, hvormed han anstillede disse, lukkede han hermetisk og anbragte dem derpaa i et Kar med kogende Vand, hvor de i Løbet af en Times Tid bleve udsatte for den tilstedeværende høje Temperatur. Efter denne Behandling optraadte der ikke Mikroorganismer i dem, ikke heller efterat de vare afkjølede; men saasnart han lod Luft strømme ind i dem, skete det derimod. Spallanzani drog den Slutning af sine Forsøg, at en Selvdannelse ikke fandt Sted, og at Kimene eller, som han kaldte dem, Æggene til Mikroorganismernes Udvikling findes i Luften; naar denne faar Adgang til de Afkog, hvormed han og Needham experimenterede, udvikle de sig videre.

Det vilde føre os for langt bort fra vor Hovedopgave, hvis vi her udførlig vilde behandle denne mærkelige Læres Historie; vi skulle derfor kun dvæle ved de Punkter deri, som have en særlig Betydning for Undersøgelserne over Sygdomme i gjærede Vædsker. I Overensstemmelse hermed citeres derfor ogsaa kun den Del af Literaturen, som direkte angaar dette Spørgsmaal.

Allerede i Aaret 1782 havde den berømte svenske Kemiker Scheele gjort en praktisk Anvendelse af Spallanzanis Experimenter. Han offentliggjorde nemlig da en Methode til at gjøre Eddike holdbar[1]). Ifølge denne fylder man Eddiken paa Flasker, propper dem vel og stiller dem i et Kar med Vand. Derpaa opvarmer man Vandet, og naar det har kogt en lille Tid, tager man Flaskerne op. Den paa denne Maade behandlede Eddike kan, som Scheele siger, holde sig i Aar og Dag uden at blive uklar og uden at fordærves. Det er den samme Methode, som anvendes den Dag i Dag.

---

[1]) Carl Wilh. Scheele, Anmärkningar om sättet at conservera Åttika (Kongl. Vetenskaps Academiens nya Handlingar. Tom III p. 120, Stockholm, 1782). Paa Fransk udkom dette Arbejde, i Følge Pasteurs Angivelse, i Scheeles: »Mémoires de Chimie«, Dijon, 1785. Kort efter Scheeles Død bleve hans Værker ogsaa udgivne i andre Sprog.

Første Gang, vi finde en Antydning af Mikroorganismernes Forhold til Sygdommene i gjærede Vædsker, er i den Udgave af Chaptals Værk: »L'art de faire le vin«, som udkom 1807[1]).

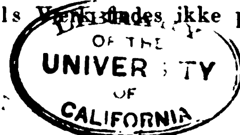
»Der er et Fænomen«, siger Chaptal, »der ikke blot har tildraget sig de talrige Forfatteres Opmærksomhed, som have beskjæftiget sig med Vinens Sygdomme, men som ogsaa har bragt dem i Forlegenhed. Jeg tænker her paa Hinderne (les fleurs du vin), som udvikle sig i Foustagerne og især i Flaskerne paa Overfladen af den aftappede Vin. Dannelsen af disse Hinder gaar altid forud for den sure Degenereren af Vinen og bebuder, at denne vil indtræde. Disse Hinder ere efter min Mening en Vegetation, en Byssus-Dannelse, som hører til Fermentsubstansen.«

Vi finde altsaa her Begreberne Sygdomme og Vegetation knyttede sammen, men nogen Vægt kunne vi aabenbart ikke lægge derpaa; det Hele er mere at betragte som en løsreven Ide, som en uklar Forestilling. Chaptals Meddelelse om dette Spørgsmaal fik i hvert Fald ingen kjendelig Indvirkning paa Forskningens Gang, og jeg har kun omtalt den, fordi den synes at indeholde den første Anelse om, at der finder et Aarsagsforhold Sted mellem de berørte Sygdomme og Mikroorganismerne.

En lignende praktisk Anvendelse af Spallanzanis Forsøg, som den foran beskrevne af Scheele, blev i Aarhundredets Begyndelse gjort af Appert. Denne udgav i 1810 en mærkelig Bog i Paris, hvoraf der i det næstfølgende Aar udkom en dansk Oversættelse ved J. F. Bergsøe. Bogens Indhold er temmelig udførligt angivet i Titelen, og jeg afskriver derfor denne. Den lyder saaledes: »Udførlig Underretning om den Maade, som Hr. Appert (forhen Conditor og Destillateur i Champagne, nu Proprietaire à Massy, Departement de Seine & Oise) har opfundet og allerede i lang Tid med største Held betiener sig af til at conservere alle Slags Substanser af Plante- og Dyreriget i adskillige Aar, for hvilken Opfindelse den franske Regiering i Betragtning af den store Nytte, som denne nye Conservationsmaade kan være til for de Søemænd, som foretage sig lange Rejser, for de Syge og Gamle i Hospitalerne, og for enhver privat Huusholdning, har tilstaaet bemeldte Hr. Appert en Belønning af Tolv Tusinde Franker«.

Appert fremhæver i sin Bog, at han har tilbragt en stor Del af sin Levetid saavel i Kjøkkenerne, som i Bryggerierne, i Vinkjælderne, i Konditorernes og Destillateurernes Fabriker og i

1) Min Kilde er i dette Tilfælde Pasteurs: »Études sur le vin«, thi Chaptals Værk findes ikke paa Bibliothekerne i Kjøbenhavn.



Urtekræmmernes Magasiner. Han var kort sagt en praktisk, dygtig Mand; men man ser tillige af hans Værk, at han har havt en ualmindelig Begavelse som Experimentator, og at han har studeret i det mindste en stor Del af den Literatur, der havde Betydning for hans Forsøg. Scheeles Opfindelse omtaler han dog ikke, og han har sandsynligvis slet ikke kjendt den. Hvis han har hørt noget derom, kunde det tænkes at være sket gjennem Gay-Lussac. I 1810 forelæste nemlig denne berømte Kemiker en Afhandling i Pariser-Akademiet om Apperts Methode, og det er derfor ikke usandsynligt, at de have staaet i personlig Forbindelse med hinanden.

Om sin Fremgangsmaade siger Appert, at den fornemlig bestaar deri: 1) At indeslutte i Flasker eller Glaskar med store Mundinger de Substanser, som man vil bevare. 2) At tilproppe disse forskjellige Kar med den største Opmærksomhed, da det fornemlig er Propningsmaaden, som bestemmer, om Udfaldet bliver heldigt eller ej. 3) At udsætte disse saaledes indesluttede Substanser for Virkningen af det kogende Vand i et Vandbad i længere eller kortere Tid efter deres Natur og paa den Maade, som det nærmere angives ved enhver Substans. 4) At tage Karrene op af Vandet paa den foreskrevne Tid. Alle Apparaterne og Haandgrebene beskrives med stor Udførlighed, og der gives nøjagtige Forskrifter for, hvorledes man skal behandle forskjellige Frugter, Kjøkkenurter, Kjød, Supper, Mælk, Frugtsafter o. s. v. I temmelig kort Tid udkom der flere Udgaver af hans Værk saavel i Frankrig, som ogsaa i andre Lande. Appert blev baade en rig og en berømt Mand.

I den fjerde franske Udgave[1]) giver han en udførlig Vejledning til at benytte Autoklaven, en Modifikation af Papins Gryde. Der findes imidlertid i denne Udgave to andre Afsnit, som have endnu større Interesse for os paa dette Sted; det ene af disse handler om Vinen, p. 131, det andet om Øllet, p. 167.

Appert meddeler, at de fineste Vine i Frankrig paa hans Tid ikke engang taalte korte Sørejser; nogle vare endog i den Grad tilbøjelige til at blive fordærvede, at man overhovedet slet ikke kunde forsende dem, men maatte drikke dem paa det Sted, hvor de vare tilberedte. Disse Vine behandlede Appert paa følgende Maade: De bleve fyldte paa Flasker indtil den nedre Del af Halsene; derpaa bleve disse hermetisk lukkede med Propper

---

[1]) Le livre de tous les ménages ou l'art de conserver, pendant plusieurs années, toutes les substances animales et végétales; par M. Appert. Quatrième édition. Paris, 1831.

og overbundne med Jerntraad. Efterat dette var sket, var der endnu et lille luftfyldt Mellemrum mellem Proppen og Vinens Overflade. Disse Flasker bleve nu anbragte i et Vandbad, hvis Temperatur han forsigtig lod stige til 70°. En Del af dem blev derpaa med Skib sendt til St. Domingo, og da de efter over to Aars Forløb kom tilbage, bleve de undersøgte. Til Sammenligning havde han henstillet nogle Flasker af den ikke opvarmede Vin i sin Bolig. Disse sidste havde en ubehagelig Smag, hvorimod den opvarmede Vin i alle Retninger var fortrinlig. Hans Forsøg havde altsaa vist, at en Vin, der ellers paa en saadan Rejse, som den omtalte, plejede at blive fordærvet, nu havde tilbagelagt denne uden at tage nogensomhelst Skade. Med berettiget Selvfølelse fremhæver han, hvilke uhyre Fordele hans Methode ogsaa paa dette Omraade kan bringe Frankrig, og da særlig dets Exporthandel, idet man herved vil blive sat i Stand til at føre Landets fine Vine til de fjerneste Egne af Kloden.

Øllet behandlede han paa samme Maade og erholdt et lignende gunstigt Resultat.

En Forklaring over, hvad der egentlig fandt Sted under Opvarmningen, formaar Appert ikke at give, men naar her ikke videre end til den Erkjendelse, at det er »Gjæringens Princip«, som bliver tilintetgjort. Han saa jo, at der i de af ham med Varme behandlede Substanser hverken indtraadte Gjæring eller Forraadnelse. Forklaringen kom først, da Cagniard Latour og Schwann havde vist, at Gjæringen skyldes mikroskopiske Væseners Virksomhed.

Længe førend man egentlig kjendte noget til selve de Aarsager, hvorfra Sygdommene i gjærede Vædsker have deres Oprindelse, havde man altsaa fundet et Middel derimod og ovenikjøbet det bedste af alle dem, som vi den Dag i Dag ere i Besiddelse af. Hvad der senere af forskjellige Teknikere blev føjet til er kun smaa Forbedringer; i alt Væsentligt anvende vi Opvarmnings-Methoden saaledes, som Scheele og Appert have udarbejdet den. En almengyldig Regel gives forøvrigt ikke her. Naar man vil opnaa et godt Resultat, maa man tillæmpe Opvarmningen efter de forskjellige Vædskers Beskaffenhed. Hvad der f. Ex. passer for den ene Øl- eller Vinsort, passer ikke altid nøjagtig for den anden.

Apperts Methode til at bevare Vin og Øl synes ikke at have fundet nogen almindelig Anvendelse; det var i hvert Fald først langt senere, nemlig da Pasteur tog Sagen i sin Haand, at dette skete. Pasteurs Bestræbelser vare særlig rettede paa at faa denne

Behandlingsmaade almindelig indført for Vinens Vedkommende. Hans Medarbejder Velten udførte Forsøg med Øl. Nu er Methoden udbredt over hele Verden under Navn af Pasteurisering.

Scheeles Navn blev paa dette Omraade helt glemt; der er ikke mange, som tænke paa, at denne smukke, praktiske Opfindelse skyldes en Skandinav.

Spallanzanis Forsøg og Resultater bleve kun godkjendte af Faa; navnlig indvendte man derimod, at den Luft, der var indesluttet i hans hermetisk tillukkede Kolber, dels var bleven forandret ved Kogningen og dels var tilstede i for ringe Mængde, til at en Selvdannelse skulde kunne finde Sted.

I Aarene 1836 og 37 anstillede Franz Schulze og Theodor Schwann derfor hver for sig en Række Forsøg. I disse blev det vist, at forskjellige Substanser, som let gaa i Gjæring og Forraadnelse, kunde holde sig uforandrede, naar man koger dem og sørger for, at den Luft, hvormed de derefter komme i Berøring, er befriet for sine Kim. Begge forsynede i den Anledning deres Kolber med Propper, som havde to Gjennemboringer, og i hver af disse anbragte de et vinkelbøjet Glasrør. Rørene tjente til at føre Luft ind i Kolben. I Schulzes Forsøg blev Luften, som efter Kogningen blev indsuget, renset ved at passere et Lag Svovlsyre. Schwann derimod rensede Luften ved at gløde den. Begges Forsøg viste, at man paa den Maade kan lede saa store Luftmængder, man vil, ind til saadanne Afkog, uden at der dog indtræder Forraadnelse, Gjæring eller Udvikling af Organismer; Forsøgene gik altsaa aldeles mod Needham og bekræftede Rigtigheden af Spallanzanis Resultater.

Aarene 1836—39 ere mærkværdige i Mikrobiologiens Historie ved Cagniard Latours og Theodor Schwanns epokegjørende Undersøgelser. Ved disse blev det nemlig for første Gang vist, at Alkoholgjæren bestaar af levende Celler, og at det er dem, der fremkalde Alkoholgjæringen. Hvad der tidligere i den Retning var bleven meddelt, var nemlig kun dunkle Formodninger.

Paa samme Tid var Kützing kommen til et lignende Resultat. I sin Afhandling derom giver han imidlertid ikke blot Beskrivelser og Afbildninger af Gjærceller, men tillige af Eddikemoderen og af forskjellige Skimmelsvampe[1]). Han har tydeligt iagttaget Forskjellen mellem Gjærcellerne og Eddikemoderens Celler, og i hvor

[1]) Kützing, Microscopische Untersuchungen über die Hefe und Essigmutter. (Journal für praktische Chemie, Jahrg. 1837, Zweiter Bd. p. 385.)

mangelfulde end hans Afbildninger af de sidstnævnte ere, vise de dog, at han virkelig allerede paa den Tid har opdaget en af de Bakterier, der fremkalde Eddikesyredannelsen. Den betegnes af ham med det systematiske Navn Ulvina aceti, fordi det er den, der giver den sure Gjæring.

Naar Vin og Øl blive eddikesure, sige vi, at de ere blevne angrebne af en Sygdom, og vi regne just denne til en af de værste. Hos Kützing finde vi for første Gang i Literaturen Oplysninger om, hvorledes en saadan Sygdom kan opstaa. Betegnelsen Sygdom benyttede han dog ikke, og han tænkte overhovedet ikke paa at gjøre sine Undersøgelser frugtbringende for Praxis.

Det samme gjælder ligeledes om Turpin. Denne Forsker udgav i 1838 en for sin Tid berømt Afhandling[1]), hvori han, ligesom Kützing, ikke blot omtaler Svampe, der fremkalde Alkoholgjæring og Edikesyredannelse, men tillige flere andre Mikroorganismer. Det Hovedresultat, hvortil han kom, udtrykker han p. 134 i følgende Læresætning: »Ingen Spaltning af Sukker, ingen Gjæring uden den fysiologiske Virksomhed af en Vegetation«. Man vidste saaledes paa den Tid, at der findes forskjellige Mikroorganismer, som fremkalde forskjellige Gjæringer; men en dybere Forstaaelse af disse Forhold havde man endnu ikke, og om de mikroskopiske Væseners Oprindelse havde saavel Kützing som Turpin helt urigtige Forestillinger.

Imod de ovenfor omtalte Forsøg af Schulze og Schwann kunde der endnu rejses den Indvending, at den Luft, som de lode strømme ind i deres Kolber, i Forvejen var bleven behandlet paa en voldsom Maade (i Schulzes Forsøg ved Udvaskning i Svovlsyre, i Schwanns ved Glødning) og herved muligvis forandret saaledes, at den døde Substans ene af den Grund ikke formaaede at blive levende. Imod denne Indvending gik de smukke Undersøgelser, som i 1854 bleve anstillede af Schröder og Dusch. Den af disse Forskere anvendte Forsøgsanordning var den samme som i de foregaaende Tilfælde, kun blev det ene af de to fra Kolbens Prop udgaaende, bøjede Rør forsynet med et Bomuldsfilter. Herigjennem lode de efter Kogningen Luften strømme ind i Kolben; Rensningen af Luften foregik altsaa i dette Tilfælde ved en Filtrering. De valgte et Filter af Bomuld, fordi det, som de sige, »er bekjendt for at holde Sygdomsmiasmer tilbage paa sin Overflade«. Den kogte organiske Substans i Kolben kom i dette For-

[1]) Turpin, Mémoire sur la cause et les effets de la fermentation alcoolique et acéteuse. Paris. Lu à l'Académie. 1838.

søg ikke blot i Berøring med store Luftmængder, men tillige med en Luft, som ikke i nogen Retning var bleven forandret i sin Sammensætning; kun de deri svævende smaa Legemer vare fjernede.

I deres Forsøg med Kjød og Vand og med Ølurt kom de til det samme Resultat som Schwann, men naar de experimenterede med Mælk og enkelte andre Stoffer, lykkedes det ikke altid. Der forblev saaledes endnu Uklarhed paa flere Punkter.

For Gjæringsindustrien have disse gamle Undersøgelser over Selvdannelse en særlig Interesse derved, at ved dem bleve ikke blot Principerne for Steriliseringen givne, men tillige Modellerne for de dertil hørende Apparater. De lærte os, at Ølurten efter Kogningen er steril, og at den vil holde sig i denne Tilstand, ogsaa naar vi lede Luft til den, hvis vi blot sørge for, at denne Luft er befriet for sine Kim. Luftrensningen har man i Praxis foretaget dels efter Schwanns, dels efter Schrøders og Duschs Methoder; den sidstnævnte har navnlig faaet en meget stor Anvendelse. De af Schulze, Schwann, Schröder og Dusch benyttede Kolber med bøjede Rør ere blevne Modeller for de forskjellige Kulturkolber, som vi nu anvende i de bakteriologiske og gjæringsfysiologiske Laboratorier. I de fleste Tilfælde lukke vi disse Kolber ved Hjælp af Schröders og Duschs Bomuldsfiltre. Det er navnlig gjennem Pasteur og hans Elever, at denne Teknik senere er bleven udviklet til en høj Grad af Fuldkommenhed. Kulturkolberne i Laboratorierne ere atter blevne Modeller for de store Apparater, som nu i mange Fabriker anvendes til Gjærens Rendyrkning.

Den første Antydning af, at nogle af Alkoholgjærsvampene selv ogsaa kunde tænkes at optræde som Sygdomsvækkere, finde vi hos Bail[1]). I 1857 udtaler han nemlig den Anskuelse, at forskjellige Gjærarter ofte fremkalde forskjellige Gjæringer. Han viser endvidere hen til, at det muligvis kunde være af praktisk Betydning at foretage en planmæssig Avl af en eller anden Gjærart.

Det er som bekjendt lettere at udtale en Ide end ved Experimenter at vise, i hvilken Grad Formodningerne ere rigtige; men først gjennem en saadan Bevisførelse blive de virkelige Erobringer gjorte, ligemeget hvad enten disse gjælde Videnskaben eller Praxis. Bail anstillede ingen Forsøg og indskrænkede sig til at udtale de ovenstaaende Formodninger. Han optræder tilmed, saavel i den

---

1) Th. Bail, Ueber Hefe. (Flora 1857, Nr. 27 u. 28, p. 438.)

ovennævnte Afhandling som endnu mere i sine senere, som Apostel for den Lære, at Hormiscium cerevisiæ (Ølgjærsvampen), ligesom andre Gjærceller, kun er et Udviklingstrin af højere Former, f. Ex. af Mucor og andre Skimmelsvampe. At hans morfologiske Opfattelse var aldeles urigtig, have navnlig de Barys og Reess's Undersøgelser vist.

I zymotekniske Skrifter fra de nærmest følgende Aar findes ogsaa af og til den Anskuelse udtalt, at der i Gjæringsindustrien optræder, saavel af Over- som af Undergjær, forskjellige Arter eller Racer. Iagttagelser i Praxis selv maatte naturligvis let føre til en saadan Opfattelse, og de i det Foregaaende omhandlede theoretiske Undersøgelser gjorde vel ogsaa deres Indflydelse gjældende.

Vi ere hermed komne til det Tidspunkt, da Pasteur traadte op. Han udgav nemlig i 1857 en Afhandling om Mælkesyregjæringen. I denne viser han, at den nævnte Gjæring skyldes et organiseret Legeme, der efter hans daværende Opfattelse staar Ølgjæren nær. At han ikke paa dette Stadium kunde faa Klarhed over, hvad det egentlig var for en Mikroorganisme, fulgte af sig selv.

I 1860 meddelte Pasteur de vigtigste Resultater af sine talrige og meget indgaaende Undersøgelser over Selvdannelse. Disse Arbejder fortsatte han gjennem de nærmest følgende Aar, og med stor Kraft og Dygtighed optraadte han imod de Forsøg, der endnu af og til fra forskjellig Side bleve gjorte paa at vise, at Needhams Lære om Selvdannelse var den rigtige. Pasteur kunde altid i saadanne Tilfælde paavise, at der var begaaet en eller anden Fejl ved de anstillede Experimenter, om Methoden end i det væsentlige var rigtig; f. Ex. at uren Luft ikke havde været fuldstændig udelukket, eller at Opvarmningen ikke havde været tilstrækkelig. Ting, der se ud som smaa Bagateller, kunne netop her faa en stor Betydning. Hvad Spallanzani og hans Tilhængere havde kæmpet for blev saaledes gjennem Pasteurs skarpsindige og udholdende Forskning endelig bragt til Sejr.

Vi have ovenfor hørt, at Kützing i 1837 offentliggjorde nogle Iagttagelser over en Eddikesyrebakterie, som han havde opdaget. Disse Undersøgelser bleve gjenoptagne af Pasteur og for første Gang underkastede en indgaaende experimental Behandling[1]).

---

[1]) Pasteur, Mémoire sur la fermentation acétique. (Annales scientifiques de l'École Normale supérieure, T. 1, 1864). Pasteur, Études sur le vinaigre. Paris, 1868.

Han gav en god Beskrivelse og Afbildning af den i de franske Edikefabriker optrædende Bakterievegetation, som han kaldte Mycoderma aceti. Ved hans Forsøg blev det med Sikkerhed godtgjort, at det er denne Vegetation, der fremkalder Dannelsen af Eddikesyre. Ogsaa Spørgsmaalets kemiske Sider behandlede han. Denne Undersøgelse hører overhovedet til de mest fremragende.

I Frankrig benytter man navnlig Vin til Eddikens Fremstilling. Gjæringen foregaar paa kun delvis fyldte Foustager paa 2—4 Hektoliters Rumfang og af den almindelige Form. Med passende Mellemrum tapper man en vis Portion Eddike ud og fylder en lignende Portion Vin til. De samme Foustager blive paa denne Maade benyttede flere Aar igjennem uden helt at tømmes og altsaa ogsaa uden at renses. Under disse Omstændigheder udvikle de saakaldte Eddikeaal sig i uhyre Mængde. Pasteur paaviste, at disse smaa Orme kunne hindre Udviklingen af Eddikesyrebakterierne og saaledes bevirke, at Gjæringen ikke foregaar paa rette Maade i vedkommende Foustager; man siger da i Fabrikerne, at den er syg (malade ou tourné). Paa Grundlag af sine foran omtalte theoretiske Undersøgelser udarbejdede han nu en ny Fremgangsmaade. I Stedet for de omtalte Foustager med de tykke Vædskelag anvendte han flade Kar, i hvilke Vædsken kunde frembyde en stor Overflade, og paa denne udsaaede han lidt af en Hindevegetation fra en foregaaende Gjæring. Efter nogle faa Dage vil under disse Omstændigheder i Almindelighed hele den Mængde Alkohol, som vedkommende Vin indeholdt, være bleven omdannet til Eddike. Karret renses derefter, og en ny Gjæring bringes i Stand paa samme Maade. Man arbejder efter denne Fremgangsmaade altsaa hurtigere end efter den ovenfor beskrevne og undgaar Eddikeaalene; desuagtet har den ikke vundet nogen Fremgang. I Frankrig anvender man endnu bestandig den gamle, langsomme Methode navnlig i den Form, som man kalder den orleanske, og i de øvrige Lande næsten udelukkende den nye tydske, hurtige Fremgangsmaade (»Schnellessigfabrikation« ved Hjælp af Træspaaner o. s. v.). En nærmere Undersøgelse af de forskjellige Fabrikationsmaaders Fortrin og Mangler vil her imidlertid ikke være paa sin Plads.

Pasteur opfattede den omtalte Bakterievegetation som bestaaende af een Art. I 1879 viste jeg, at der derunder indbefattes to vel adskilte Arter, og jeg betegnede den ene af disse med min berømte Forgængers Navn, idet jeg kaldte den Mycoderma Pasteurianum. Zopf og andre Bakteriologer have senere forandret Slægtsnavnet til Bacterium. Arternes Antal er i den nyere Tid atter bleven forøget ved nye Undersøgelser, dels af mig, dels af

Andre. Iblandt disse Eddikesyrebakterier findes der flere, hvis Virksomhed er tydelig forskjellig; det er derfor rimeligt, at man en Gang ogsaa vil komme til at indføre en lignende Reform i Eddikefabrikationen som det er lykkedes mig at indføre i Bryggerivæsenet, nemlig at anvende en Renkultur af en planmæssig udvalgt Art. Hidtil er der imidlertid intet Skridt gjort i den Henseende; man arbejder endnu bestandig paa Slump.

Gjennem Pasteurs og hans Forgængeres Undersøgelser var det saaledes slaaet fast, at der gives forskjellige Mikroorganismer, som fremkalde forskjellige Gjæringer: Alkohol-, Mælkesyre-, Eddikesyre-, Smørsyregjæring o. s. v. Vilde man altsaa have en ren Alkoholgjæring, fri for ubehagelige Syredannelser, saa maatte man selvfølgelig holde de Mikroorganismer borte, som fremkalde disse sidstnævnte Gjæringer. Denne Konsekvens drog Pasteur og gav den først en praktisk Anvendelse paa Vinen[1]).

Fra gammel Tid havde man vidst, at denne Vædske er udsat for forskjellige uheldige Omdannelser, hvorved baade dens Smag og Udseende i høj Grad kan tage Skade. Den kan f. Ex. blive sur, bitter, slimet, uklar o. s. v. Men Aarsagerne hertil bleve først opdagede af Pasteur, idet han paaviste, at disse uheldige Forandringer, Sygdomme, skyldes forskjellige Bakterier. Som Middel herimod anbefalede han at anvende den foran beskrevne Opvarmnings-Methode af Scheele og Appert. Dette maa selvfølgelig ske paa et tidligt Stadium af Sygdommen, førend Bakterierne endnu have faaet Lejlighed til i nogen betydelig Grad at formere sig. Er Vinen først en Gang bleven fordærvet, nytter det ikke at dræbe Fjenderne.

Angaaende Vinens Alkoholgjæring mener Pasteur, at man paa Grund af Vinmostens gunstige kemiske Sammensætning uden Fare kan lade den blive besørget af de Gjærsvampe, der tilfældigvis findes paa Druernes Overflade og i Luften. Denne Anskuelse udtalte han ogsaa senere i det nedenfor citerede Værk, Studier over Øllet, p. 4.

I sin Bog om Alkoholgjærsvampene[2]) giver Reess en systematisk Beskrivelse af forskjellige Gjærformer, og han gaar heri ud fra den Anskuelse, at Cellernes Form og Størrelse for sig alene yde absolute Artsmærker. De store, ovale Gjærceller blive da henførte til Sacch. cerevisiæ, de ovale, mindre Celler til Sacch. ellipsoideus, de pølsedannede til Sacch. Pastorianus o. s. v. Mine

[1]) Pasteur, Études sur le vin. Paris, 1866.

[2]) Reess, Botan. Untersuchungen über die Alkoholgährungspilze, 1870.

Undersøgelser have, som det erindres fra mine tidligere Afhandlinger, vist, at denne Opfattelse er aldeles urigtig. En og samme Art kan nemlig optræde med Celler, som kunne henføres til alle de af Reess som selvstændige Arter opstillede Former. Til Forestillingen om forskjellige Arter knytter sig naturligvis ligeledes Forestillingen om forskjellige Virksomheder; begge disse Ideer udtales ogsaa af Reess.

P. 21 viser han hen til den Mulighed, at den Fremgangsmaade at skifte Gjær, som den Gang fandtes i alle Bryggerier, kan være begrundet deri, at Gjæren bliver blandet med forskjellige Svampe, som findes i vedkommende Lokaler, og at disse Svampe under deres Vært paa en skadelig Maade gribe ind i Gjærens Virksomhed. P. 40 udtaler han tillige den Formodning, at der ved Siden af Sacch. cerevisiæ ogsaa kan optræde Alkoholgjærsvampe, som kunne fremkalde skadelige Gjæringer.

I det følgende Aar udkom to Meddelelser om Sygdomme i Øl, fremkaldte af Alkoholgjærsvampe, den ene af Holzner, den anden af Lintner sen.[1]). Da begge disse Arbejder bragte det samme Resultat, omtales de her under et. Der beskrives deri en farlig Sygdom, som paa den Tid hjemsøgte Undergjærings-Bryggerierne. Den ytrede sig paa den Maade, at Øllet kun med Vanskelighed blev klart i Lagerfadene, og naar dette endelig var sket, blev det ved Aftapningen igjen tykt, idet det nemlig blev opfyldt med talløse smaa Gjærceller. Ved den mikroskopiske Undersøgelse mente de at kunne henføre disse til den af Reess opstillede Art, Sacch. exiguus. Forsøg anstillede de ikke, og de gik dèn Gang ud fra, at de af Reess beskrevne Arter ere virkelige Størrelser. Da dette, som vi have hørt, ikke er Tilfældet, saa kunde deres Undersøgelser ikke heller bringe nogen sikker Oplysning. De havde dog den Fortjeneste, at de for første Gang henledede Zymoteknikernes Opmærksomhed paa de smaa, lette Gjærceller og paa de Farer, som disse muligvis kunne fremkalde.

Fra den Tid af blev der af forskjellige Forfattere hyppigt offentliggjort smaa Meddelelser i Bryggeri-Tidsskrifterne om Sacch. exiguus; de bragte dog intetsomhelst Nyt og forbigaas derfor. Om mine Undersøgelser over denne Art henvises til det Følgende.

Man mente nu at finde den nævnte lille Gjærsvamp overalt, hvor der var noget Galt paa Færde med Øllet, og bestandig gik man herved ud fra den fejlagtige Forestilling, at det var en med Sikkerhed bekjendt Størrelse, som man ved Mikroskopets Hjælp

[1]) Der Bayerische Bierbrauer. München, 1871, p. 14 og p. 64.

altid kunde opdage. Paa denne Maade tog Engel ogsaa Sagen[1]). Den bekjendte Brygger Gruber i Strassburg havde iagttaget, at hans Øl fik en ejendommelig Sygdom, naar det havde tilbragt 6—9 Maaneder i Lagerfadene. Denne Sygdom bestod deri, at der indtraadte en ny Gjæring, som gjorde Øllet opaliserende og gav det et grønladent Skjær. Naar denne Gjæring standsede, klarede Øllet, men havde da fuldstændig tabt sin oprindelige, friske, gode Smag og derimod faaet en vinagtig Smag. Ved at undersøge dette Øl med Mikroskopet fandt Engel talrige smaa Gjærceller, og efter Datidens Skik bestemte han dem uden videre som Sacch. exiguus, samt udtalte den Formodning, at det maatte være dem, der fremkaldte den omtalte Eftergjæring. Undersøgelserne gik den Gang rask fra Haanden, men Resultaterne bleve ogsaa derefter.

En Formodning, som ligeledes kom frem paa den Tid, var, at de forskjellige Vin- og Ølsorter vistnok hver havde sin egen Gjærart. Dette blev f. Ex. udtalt af Cohn i hans »Beiträge zur Biologie der Pflanzen«. I. Bd. 2. Hefte, 1872, p. 136.

Medens Engel i god Tro og uden Kritik fulgte Reess i hans Opfattelse af Arterne, var dette derimod ikke Tilfældet med Cienkowski[2]). Han mener, at de af Reess opstillede Saccharomyces-Arter kun ere Udviklingsformer af Mycoderma vini. Flere andre Forskere udtalte ligeledes en Opfattelse, der stemmede temlig nøje overens dermed; saaledes ogsaa Harz i sine »Grundzüge der alkohol. Gährungslehre«, 1877. Dette Standpunkt var den Gang fuldstændig berettiget, da Grundlaget for Reess's Artsbeskrivelser, som vi have hørt, jo var aldeles uholdbart. Hvis der med denne forandrede Opfattelse overhovedet kunde være Tale om, at selve Gjærcellerne skulde kunne fremkalde Sygdomme, saa maatte man i ethvert Fald se dette fra et helt andet Synspunkt end tidligere. Man havde da ikke længere fremmede Arter for sig, som udenfra trængte sig ind i Urten og i Øllet for her at begynde en Konkurrence med Bryggerigjæren, men det hele Spørgsmaal maatte overføres paa et helt andet Omraade. Der kunde da kun være Tale om en Udarten af Bryggerigjæren under forskjellige Ernæringsforhold. Fra et praktisk Standpunkt betragtet vilde Opgaven altsaa blive den at udforske disse.

---

[1]) Engel, Les ferments alcooliques. Paris, 1872, p. 30.
[2]) Cienkowski, Die Pilze der Kahmhaut. (Bull. de l'Acad. de St. Petersbourg, T. XVII, 1873.)

Man diskuterede saaledes disse vigtige Spørgsmaal frem og tilbage uden at anstille afgjørende Forsøg. I 1876 udkom derpaa Pasteurs berømte Værk om Øllet og dets Sygdomme[1]).

Det erindres, at han i sine foran omtalte Studier over Vinen havde vist, at en hel Række Sygdomme i denne Vædske skyldes Bakterier. For Øllets Vedkommende paaviste han nu, at noget Lignende finder Sted (p. 4—7). Det maa endvidere fremhæves, at han gjennem nøjagtige Experimenter førte et fuldgyldigt Bevis for Rigtigheden af denne Lære (p. 20 og 26). Han drog nu den for Praxis vigtige Slutning, at enhver Bakterievegetation, som kan angribe Urten eller Øllet, maa anses som farlig for hele Driften, og at man ved alle Midler maa sørge for, saa vidt mulig, at holde Bakterierne borte. Da disse smaa Væsener ved deres Form kunne skjelnes fra Gjærcellerne, anbefalede han at foretage mikroskopiske Undersøgelser i Bryggerierne, saavel af Paasætningsgjæren som af Øllet. Til at rense Gjæren angav han flere Methoder, men foreslog navnlig hertil en Dyrkning i en Opløsning af Rørsukker, hvortil der er sat lidt Vinsyre (p. 224). Det var i ethvert Fald særligt denne Methode, som blev anbefalet af hans Elever.

Med Hensyn til Gjærcellerne gjentog Pasteur paa flere Steder i sit Værk (se navnlig p. 218—220) de af hans foran nævnte Forgængere, Reess, Engel, Holzner og Lintner udtalte Anskuelser. Paa andre Steder (f. Ex. p. 193) synes han derimod nærmest at slutte sig til den modsatte Opfattelse af Cienkowski og Harz, nemlig at Gjærcellerne ere underkastede en grændseløs og hurtig Variation, og at der ikke findes bestemte Saccharomyces-Arter (altsaa ej heller Sygdomsgjærarter).

I Overensstemmelse hermed staar ogsaa den Mening, som han p. 333 udtaler, nemlig at Øl-Undergjær under Bryggeriforhold kan blive omdannet til Overgjær. Idet han (p. 199) nærmere undersøger en særegen Gjærform (osteagtig Gjær), som han fandt i engelsk Bryggerigjær, henviser han til den Mulighed, at den kan være en Udviklingsform af Kulturgjæren. Hvor han taler om Gjærsvampene, er alt endnu i Bølgegang; de sikre Grændser drages intetsteds, thi der, hvor de skarpe Spørgsmaal stilles, standse hans Undersøgelser, og vi faa som Regel et mystisk Svar, der kan forstaas paa mere end een Maade.

Hvad Spørgsmaalet om Pleomorfismen angaar, da havde Pasteur væsentlig en lignende Anskuelse som Bail, i det han nemlig antog, at Saccharomyceterne ere Udviklingsformer af visse

---

[1]) Pasteur, Études sur la bière. Paris, 1876.

brune Skimmelsvampe (Dematium og Alternaria), der f. Ex. findes paa Overfladen af forskjellige Frugter (p. 154—155, 164—165, 177). At Pasteur kunde komme til en saadan urigtig Opfattelse forstaas let, naar man erindrer, at han ingensinde skjelner mellem Saccharomyces (Gjærceller med Endosporedannelse) og Ikke-Saccharomyceter (Gjærceller uden Endosporedannelse). Hans Fremstilling er paa hele dette Omraade rig paa modstridende Meninger og er nærmest at betegne som en Diskussion af forskjellige Muligheder. En videnskabelig Afgjørelse blev ikke opnaaet paa noget Punkt. Af disse Grunde er hans Værk vanskeligt at læse, og endnu vanskeligere bliver det at faa Klarhed over, hvad hans Mening egentlig er paa disse Omraader, fordi han kun sjeldent drager Grændsen mellem det, der ved Forsøg er bevist, og det, som kun er en Gisning. Forgængerne nævnes som Regel kun, naar han ønsker at berigtige en eller anden Vildfarelse i deres Arbejder; en historisk Fremstilling af, hvorledes Udviklingen er foregaaet, findes ikke i hans Værk. Pasteur har dog ej heller nogensteds sagt, at han vilde give en saadan, og det er altsaa en stor Fejltagelse, naar man, som det jævnlig er sket, har villet søge den deri.

Det Sted, hvor han paa den tydeligste Maade taler om Øl-Sygdomme, som skyldes Alkoholgjærsvampe, er p. 218. Han omtaler paa dette Sted, at man i nogle Bryggerier i Vinter-Maanederne brygger en Sort Lagerøl, der først i August eller September næste Aar skal gaa til Kunderne, og at man med Hensyn til dette Øl er meget ængstelig for, at det i Løbet af den lange Lagringstid skal faa en vinagtig Smag. »Ifølge mine Iagttagelser,« siger han, »synes denne vinagtige Smag hovedsagelig at hidrøre derfra, at Bryggerigjæren er blandet med Sacch. Pastorianus eller med dennes Varieteter.«

Det er altsaa med stor Forsigtighed, at Pasteur giver sin Mening tilkjende; noget bestemt siger han ikke. Imod den af hans Forgænger, Engel, udtalte Formodning, at det er Sacch. exiguus, der fremkalder denne Sygdom, opstiller han, som vi saa, kun en ny Formodning, nemlig at det maaske er en anden Art. Ligesaa lidt som Engel gjør Pasteur Forsøg paa at udskille den eller de Mikroorganismer, der foraarsage Sygdommen, fra den gode Bryggerigjær, for derefter at fremstille Øl, der i det ene Tilfælde er gjæret med den sidstnævnte Gjær for sig alene, i det andet Tilfælde med en Blanding af denne og af den tænkte Sygdomsgjær. Men dette er den eneste Vej, ad hvilken vi kunne erholde Klarhed over, hvad der er Sygdomsgjær, og hvad der er god Bryggerigjær. Aarsagen til, at hverken Pasteur eller nogen

af hans Forgængere udførte saadanne afgjørende Forsøg, er den, at de Methoder, som paa den Tid stode til deres Raadighed, ikke tillode det.

Hvilken Uklarhed der i 1876 herskede med Hensyn til de to store Spørgsmaal om rendyrket Bryggerigjær og om Sygdomme i Øl, fremkaldte af Alkoholgjærsvampe, ses endvidere deraf, at Pasteur kunde anbefale den foran omtalte Fremgangsmaade til Gjærens Rensning (Dyrkning i Saccharose-Opløsning, hvortil der er sat lidt Vinsyre). Forsaavidt Talen kun er om at undertrykke Bakterier, er hans Methode upaaklagelig, men da Bryggerigjæren i Almindelighed tillige indeholder større eller ringere Indblandinger af vild Gjær, vil, som mine Forsøg have vist, Behandlingen med Vinsyre i de allerfleste Tilfælde bevirke, at den gode Bryggerigjær bliver fortrængt, og at Sygdomsgjærarterne derimod begunstiges i deres Udvikling! (Se min Afhandling: »Hvad er Pasteurs rene Gjær?« Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet, III Bind, 1. Hefte, 1891). For paa den rette Maade at bedømme Pasteurs Standpunkt, maa vi imidlertid se det i historisk Belysning af sin Tid. Vi kunne da næppe tænke os, at det den Gang kunde være muligt at faa Klarhed over dette Grundspørgsmaal. Som vi senere skulle se, var man i Begyndelsen af Firserne ikke heller kommen videre.

En saadan Methode, som den af Pasteur angivne, maatte naturligvis snart vise sig at være ubrugelig i Bryggerierne, og den blev ogsaa hurtig opgiven, hvor den blev prøvet.

Til Dyrkning af den omtalte Gjær konstruerede Pasteur særegne Kar (p. 326—340). Det var endvidere hans Mening, at de aabne Svalebakker i Bryggerierne skulde fjernes og erstattes med lukkede Beholdere, i hvilke den fra Kjedlen kommende koghede Urt kunde blive nedsvalet og luftet uden paa nogen Maade at blive inficeret. Ogsaa dertil konstruerede han en passende Beholder (p. 371—378).

Disse Apparater bleve kort Tid efter tillempede efter de praktiske Forhold i Bryggerierne af Pasteurs Medarbejder, Velten. Naar Velten i den Anledning i de senere Aar er traadt op i de franske Bryggeritidsskrifter som Opfinder af noget helt Nyt, saa glemmer han dog, at Principet for Steriliseringen og for de dertil hørende Apparater allerede fuldstændig var givet af Pasteurs Forgængere; desuden var det Pasteur og ikke Velten, som først gjorde en teknisk Anvendelse deraf i Bryggerivæsenet. Veltens Konstruktion var tilmed i flere Henseender mindre heldig.

Disse Apparater faa selvfølgelig deres hele Betydning ved Gjæren. Hvis denne ikke er en virkelig Renkultur, fri for alle

Sygdomskim, saa ere de værdiløse. Da Pasteurs Gjær, som vi have hørt, slet ikke tilfredsstillede denne Fordring, saa fulgte deraf, at Apparaterne ej heller kunde vinde Indgang i Bryggerierne.

Ni Aar senere kom de til Hæder og Værdighed. Som det erindres, lykkedes det mig i 1883 at indføre rendyrket Gjær af en planmæssig udvalgt Race i Bryggeridriften, og da i det følgende Aar denne vigtige Reform var bleven gjennemført paa Bryggeriet Gl. Carlsberg og andensteds, var hermed ogsaa Stødet givet til Afskaffelsen af Svalebakkerne. De Apparater, som i den Anledning i 1885 bleve konstruerede paa Carlsberg, afvige i flere Henseender fra de af Velten konstruerede, navnlig i Henseende til den Maade, hvorpaa Luften steriliseres. Velten anvendte hertil Schwanns Methode ved Glødning; i Carlsberg-Apparaterne renses Luften derimod ved Hjælp af de i det Foregaaende omtalte Bomuldsfiltre af Schrøder og Dusch. Denne Methode har nemlig vist sig at være meget mere praktisk. (I nærværende Tidsskrifts II. Bd. 5. H. 1888, p. 281 har jeg meddelt Undersøgelser over Luftens Rensning ved Hjælp af Bomuldsfiltre p. 294 og en Beskrivelse af det af Bryggeridirektør, Kapt. Kühle og mig i Forening konstruerede Rendyrknings-Apparat).

Med min rendyrkede Gjær ere disse Apparater i de senere Aar blevne udbredte over en stor Del af Jorden. Som man kunde vente, maatte Renkulturen af de planmæssig udvalgte Racer gaa forud.

Hermed har jeg gjort Rede for den Del af Pasteurs Værk, der har direkte Hensyn til de Spørgsmaal, som skulle behandles i nærværende Afhandling. Jeg har ikke blot fremhævet de betydningsfulde Fremskridt, som min berømte Forgængers Undersøgelser bragte, men ogsaa angivet Grundene, hvorfor de ikke kunde bringe Løsningen af de to vigtige Problemer om Sygdommene i Øl og om rendyrket Gjær. Ved den af Pasteur anbefalede Fremgangsmaade blev den gode Bryggerigjær undertrykt og Sygdomsgjærarterne begunstigede. Ad den Vej, hvorpaa han slog ind, var det overhovedet ikke muligt at naa Maalet.

I det samme Aar, i hvilket det foran omtalte Værk udkom, udgav Lintner sen. nogle zymotekniske Undersøgelser[1]). Der tales heri om forskjellige Forstyrrelser i Gjæringen og om Sygdomme i Øllet, som have voldet Bryggerierne megen Besvær og store Pengetab. Den mikroskopiske Undersøgelse kunde ingen Oplysning give, og Lintner meddeler endog, at en Gjær, som, naar den blev bedømt

---

[1]) C. Lintner sen., Über einige Resultate zymotechn. Untersuchungen. (Zeitschr. für das ges. Brauwesen. München, 1876, p. 221.)

efter en saadan Prøve, maatte betegnes som god, desuagtet gav et slet Resultat i Bryggeriet. Omvendt erholdt han et godt Resultat med en anden Gjær, skjøndt denne netop ved den mikroskopiske Undersøgelse saa ud til at være uheldig, idet den nemlig indeholdt mange smaa og uregelmæssige Celler (leichte Hefe). Denne tilsyneladende forkastelige Gjær gav dog aldeles normale Gjæringer og blev med det bedste Held anvendt i forskjellige Bryggerier.

Et udmærket Exempel paa, hvor lidet den mikroskopiske Undersøgelse for sig alene formaar at udrette paa dette Omraade! Man kan næppe tænke sig en skarpere Kritik af den Tids Undersøgelses-Methoder.

Der er faa Værker, som ved deres første Fremtræden have fremkaldt saa megen Opmærksomhed, som Nägelis Værk om de lavere Svampe[1]). Den Virkning, som det senere udøvede, har dog ikke svaret til Forventningerne, thi det er for fattigt paa Beviser i Forhold til de mange Paastande, som det indeholder. Om Saccharomyceterne og Bakterierne udtaler Nägeli p. 20—22 den Anskuelse, at Arterne have Evne til en hurtig og rig Variation saavel i morfologisk som i fysiologisk Henseende, og at mange af Formerne med Lethed lade sig overføre i hverandre. Ogsaa om den særlige Gjæringsvirksomhed, hvoraf en Form kan være i Besiddelse, mener han, at den hurtigt gaar tabt ved Kultur eller omdannes til en helt anden Funktion. Efter Nägeli flyde saavel de morfologiske som fysiologiske Former med Lethed over i hverandre, Intet er fast. Næringsbundens kemiske Sammensætning, de ydre Forhold træde op som almægtige, skabende Magter, fremkaldende Omdannelser i forskjellige Retninger. Hvorledes Nägeli egentlig stiller sig til Artsbegrebet, er forøvrigt vanskeligt at se, og experimentelle Beviser for de enkelte Tilfælde giver han, som sagt, ikke. En lignende Opfattelse udtaler han ligeledes i sin »Theorie der Gärung«, 1879, p. 120.

I sine zymotekniske Tilbageblik paa Aaret 1877 fremhæver Holzner[2]), at de forhaandenværende Undersøgelser ingen sikker Vejledning give for Bryggerne med Hensyn til Forstaaelsen af de Forstyrrelser i Gjæringen, der saa ofte optræde, og han viser særlig hen til den Uklarhed, der hersker over Gjærarterne. For nogle er enhver Form en særlig Art, for andre gaa de opstillede

---

[1]) Nägeli, Die niederen Pilze in ihren Beziehungen zu den Infectionskrankheiten und der Gesundheitspflege. München, 1877.

[2]) Holzner, Zymotechn. Rückblicke auf das Jahr 1877. (Zeitschr. für das ges. Brauwesen. München, 1878, p. 142.)

Arter med Lethed over i hverandre. Vi staa her overfor Gaader og endnu uopklarede Spørgsmaal. Med Beklagelse fremhæver han: »Til Dato er Antallet af Hypotheserne over Gjæringens Væsen, over Gjærsvampenes Morfologi, Biologi og Fysiologi ikke blevet mindre, men er tværtimod stadig blevet større og større.« Og han viser hen til sin berømte Landsmand Nägeli som til den, hvorfra Hjælpen og Klarheden muligvis kan komme.

Naar man gjennemlæser de forskjellige Bryggeritidsskrifter, som bleve udgivne i den Periode, hvortil vi nu ere komne, saa finde vi, at de hyppigt gjenlyde af Klager over Forstyrrelser i Gjæringen og over Tab og Vanskeligheder, fremkaldte ved Sygdomme i Øllet. En saadan Klage møder os ogsaa i nedenstaaende Afhandling af Lintner sen[1]).

Han fremhæver heri, at den Sygdom, som vi kalde Gjærtykhed, tager Overhaand. »Det færdig lagrede Øl«, siger han, »er fuldstændig klart, medens det bliver tappet fra Fadet i den kjølige Lagerkjælder, men naar det derefter paa Flasker og Foustager kommer op i varmere Lokaler, bliver det efter kort Tids Forløb tykt. I saadant Øl finder man da smaa Gjærceller, som formere sig med stor Hurtighed og tilsidst fuldstændig aflejre sig paa Bunden. De tydske Bryggere kalde denne Gjær paa Grund af dens ringe Vægtfylde for »Flughefe«.

Aarsagen hertil, mener Lintner, kan dels søges i den Indflydelse, som daarligt Malt kan have paa Gjærens Ernæring, dels deri, at Bryggerne ikke sætte en tilstrækkelig Portion Gjær til Urten, og at de føre Gjæringen ved en for lav Temperatur. Lintner antager, at den normale Bryggerigjær under disse Omstændigheder vil gjennemgaa en uheldig Omdannelse, saa at den kommer til at udvikle de omtalte smaa lette Celler, og at det er paa den Maade. at Sygdommen opstaar. En Bekræftelse paa Rigtigheden af en saadan Opfattelse finder han i Nägelis theoretiske Spekulationer. Næste Aar gjentog han den samme Anskuelse[2]).

Som det erindres, mente man tidligere, at den beskrevne Sygdom blev fremkaldt af Sacch. exiguus. Denne Opfattelse har man i 1881 aldeles forladt. Aarsagen til den beskrevne eller lignende Sygdomme i Øllet søges nu ikke længere i fremmede Gjærarter og i en udenfra kommende Smitte, men i de Ernærings-

---

[1]) C. Lintner sen., Ueber Malz und dessen Einfluss auf die Haltbarkeit und Güte des Bieres. (Zeitschr. für das ges. Brauwesen. München, 1880, p. 384.)

[2]) C. Lintner sen., Altes und Neues über Bierbrauerei (Zeitschr. für das ges. Brauwesen. München, 1881, p. 153.)

forhold, hvorunder selve Bryggerigjæren befinder sig. Efterat Reess's og Pasteurs Lære havde ladet Bryggerne i Stikken, viser Lintner nu ligesom Holzner hen til Nägelis fysiologiske Theorier som Frelsen. De fleste Gjæringsteknikere paa den Tid sluttede sig ligeledes til denne Retning, saaledes ogsaa Delbrück og Hayduck i Berlin.

Diskussioner om Bryggerigjærens Udarten og Omdannelse kom altsaa nu i Forgrunden, og man mente at finde Løsningen af Gjærspørgsmaalet ad kemisk-fysiologisk Vej[1]).

De berørte kemisk-fysiologiske Undersøgelser, hvortil Nägeli gav Stødet, have dog ikke bragt Klarhed over Gjærspørgsmaalet i nogen Retning, ej heller hvad Spørgsmaalet om Bryggerigjærens Udarten og Omdannelse angaar. For at man paa en videnskabelig Maade overhovedet skulde kunne tage fat paa denne Opgave, maatte mine botaniske Undersøgelser gaa forud. Ad denne Omvej vil Forskningen atter komme tilbage til disse vigtige Problemer, og det er ikke usandsynligt, at Nägelis Ideer, naar Grændserne gjennem exakte Experimenter ere fastsatte, igjen ville komme til Ære.

Efter at Pasteur i 1876 havde opgivet sine Studier over Øllet og dets Sygdomme, blev der vel i de nærmest derefter følgende Aar offentliggjort nogle Undersøgelser i den samme Retning af hans Elever, men ingen, som have direkte Hensyn til de Spørgsmaal, som vi her skulle behandle. Det Standpunkt, hvortil den franske Skole var naaet i 1883, finde vi angivet i Duclaux' Haandbog[2]), og vi ville derfor dvæle et Øjeblik ved dette Værk. P. 300 har Duclaux et Kapitel om Bryggerigjærens Rensning, hvori han anbefaler den af os tidligere omtalte Fremgangsmaade af Pasteur. At denne hertil er ubrugelig, da man, som vi have hørt, ved at anvende den, netop begunstiger Udviklingen af nogle af de farligste Sygdomskim, var altsaa paa den Tid endnu ikke erkjendt. Angaaende Undersøgelsen af Bryggerigjæren meddeler Duclaux p. 471, at man ved Hjælp af Mikroskopet kan afgjøre, om Gjæren er ren eller ej. Ved at læse nøjere efter, se vi da ogsaa i Overensstemmelse hermed, at han ved Sygdomskim kun tænker paa Bakterier og ikke paa Saccharomyceter; denne Opfattelse gjentages ligeledes p. 618, hvor Øllets

[1]) De, som ønske nærmere at studere Enkelthederne, kan jeg paa dette Punkt, som ogsaa andensteds, henvise til det flere Gange citerede Zeitschr. für das ges. Brauwesen. I dette Tidsskrifts 26 Aargange ere i Virkeligheden Dokumenterne til Bryggerivæsenets Historie for det nævnte Tidsrum nedlagte.

[2]) Duclaux, Chimie biologique. Paris, 1883.

Sygdomme gjennemgaas i et selvstændigt Kapitel. Det er fuldstændig det samme Standpunkt, hvortil Pasteur var naaet for syv Aar siden. Hvis Duclaux havde kjendt de Undersøgelser, som jeg i 1883 udgav, vilde hans Opfattelse sikkert være undergaaet en væsentlig Forandring.

Paa denne Tid fik Bakteriologien nyt Liv i Tydskland ved Robert Kochs Undersøgelser, og der samlede sig hurtig talrige Elever om den berømte Forsker. De Opgaver, hvormed denne Skole beskjeftigede sig, vare hovedsagelig saadanne, som havde direkte Betydning for Lægekunsten. Kun undtagelsesvis blev der fra den Side offentliggjort gjæringsfysiologiske Undersøgelser; iblandt disse maa særlig fremhæves Hueppes Studier over Mælkesyrebakterier. Alkoholgjærsvampene skjænkede hverken Koch eller hans Elever nogen Opmærksomhed; for saa vidt de overhovedet omtale dem, sker dette kun paa en meget flygtig Maade. Aarsagen dertil er let at forstaa, naar man erindrer, at disse Svampe have liden eller slet ingen Interesse for Pathologen og Hygiejnikeren.

Nogle Aar tidligere havde Fitz begyndt sine værdifulde Undersøgelser over forskjellige Bakterie-Arter og deres Gjæringsprodukter. Disse Arbejder beskjeftige sig vel ligesaa lidet som de foran nævnte af Hueppe med Sygdomme i gjærede Vædsker, men de belyse dog indirekte paa flere Maader Spørgsmaalet om Sygdomme, fremkaldte af Bakterier.

Endnu i 1884 udtalte Thausing[1]) sig saaledes om disse Spørgsmaal: »Videnskaben har ganske vist givet os smukke Undersøgelser over Gjæringsorganismerne og over Gjæringens Væsen; men af Resultater, som direkte kunne anvendes i Bryggeri-Praxis, saa godt som slet Intet; nu som før er Gjæringsprocessen indhyllet i et mystisk Mørke for Praktikeren. Hansens Undersøgelser over Gjær-Rendyrkningen berettige os vel til store Forhaabninger; hvis de ikke skuffe os, saa staa vi her overfor en Erobring, hvis Betydning ikke kan sættes højt nok. Indtil videre maa vi dog regne med Forholdene, som de for Øjeblikket virkelig ere.« Dette var i 1884 det almindelige Standpunkt.

De Arbejder, som jeg i Løbet af de nærmeste Aar offentliggjorde, og de Resultater, som derved efterhaanden bleve vundne i den store Gjæringsindustri, bragte Tvivlen hos Thausing til at

[1]) Jul. Thausing, Einfluss der Hefegabe auf Hauptgährung, Hefe und Bier. Aus dem 14. Jahresberichte der ersten österr. Brauerschule in Mödling. Ogsaa i Allgem. Zeitschr. für Bierbrauerei. Wien, 1884, p. 872.

forsvinde. I den tredie Udgave af sin berømte Haandbog over Ølfabrikationen optog han mit Gjær-Rendyrkningssystem paa en for mig hædrende Maade.

Hermed ere vi komne til Slutningen af vor historiske Oversigt. Det følgende Kapitel vil handle om de Undersøgelser over Sygdomme i Øl, som jeg siden 1881 har anstillet. Flere af de sideløbende Strømninger, som have havt Indflydelse paa Udviklingen af Læren om Sygdomme i gjærede Vædsker, ere kun flygtigt blevne berørte og andre slet ikke omtalte. Hertil høre navnlig Undersøgelser over Plantesygdomme, som fremkaldes af Svampe, og over de smitsomme Sygdomme hos Mennesket og Dyrene, der skyldes Bakterier.

Experimentelle Undersøgelser i den førstnævnte Retning bleve allerede anstillede i Aarhundredets Begyndelse, og som en Banebryder paa den Tid maa Danskeren Schøler nævnes. Ogsaa paa dette Omraade arbejdede Forskningen sig langsomt, men sikkert, fremad til større og større Klarhed. I den nyere Tid udmærkede de danske Botanikere A. S. Ørsted og E. Rostrup sig. Med særlig Glands straale Navnene Tulasne og De Bary paa dette Omraade.

Allerede hos Linné og flere af hans Samtidige finde vi den Ide udtalt, at Gjæring, Forraadnelse og Smitsygdomme skyldes mikroskopiske Væsener. I 1840 viste Henle med stor Skarpsindighed, at de foreliggende Kjendsgjerninger og Iagttagelser viste hen til, at Smitsygdommene maatte hidrøre fra mikroskopiske Organismers Indgriben. Experimentelle Beviser kom dog først i den nyere Tid, og her vandt Pasteurs Undersøgelser den største Berømmelse.

Den unge Videnskab om Mikroorganismerne har i alt Væsentligt sin Oprindelse fra den meget ældre om de højere Plante- og Dyreformer. Ligesom Biologien overhovedet har ogsaa Mikrobiologien modtaget meget stærke og meget væsentlige Paavirkninger fra Darwins epokegjørende Theorier om Arternes Omdannelser. Dette er navnlig sket gjennem Nägelis foran berørte Arbejder.

Endelig maa ogsaa fremhæves den Vexelvirkning, der altid har fundet Sted imellem Mikrobiologien og Kemien.

Alle disse forskjellige Retninger have gjensidig befrugtet og paa mange Maader indvirket paa hverandre. Hvis vi i den ovenfor staaende historiske Fremstilling havde kunnet dvæle derved, vilde den vel have vundet i Liv og Fylde, men den vilde da tillige være svulmet langt ud over de Grændser, som der i nærværende Afhandling maatte drages derfor.

---

## 3. Mine Undersøgelser.

### Opgaven og Undersøgelsesmethoden.

I den foregaaende historiske Fremstilling have vi set, hvorledes man i Spørgsmaalet om Alkoholgjærsvampenes Forhold til Sygdomme i Øl efterhaanden havde gjættet paa de mange Muligheder; hver Gang man var i Færd med at komme ind paa den rette Vej, gjorde man atter hurtig en ny Vending for ligesom netop at opsøge de vildsomme Stier.

Efter Fremkomsten af Nägelis Værker traadte, som vi have hørt, Ideen om Bryggerigjærens Udarten og Omdannelse i Forgrunden. Heri søgte man Aarsagen til de Sygdomme i Øllet og Forstyrrelser i Driften, hvorom man antog, at de maatte hidrøre fra Gjæren. Tanken ledtes saaledes mere og mere bort fra den anden Hovedmulighed, at Aarsagen ogsaa kunde søges deri, at fremmede Arter vare trængte ind og i deres Konkurrence med Kulturarterne havde fremkaldt Sygdomsfænomenerne. Den Opfattelse fik, som sagt, Overvægt, at endog dybt indgribende Omdannelser af den gode Bryggerigjær med Lethed fandt Sted i Driften selv. Deraf fremkom den megen Tale om »Gjærens Degenereren«. Experimenter indlod man sig ikke paa.

I min Doktordisputats, som udkom i 1879, stod ogsaa jeg i alt Væsentligt paa dette Standpunkt. Ved at gjennemtænke Spørgsmaalet kom jeg imidlertid snart til den Erkjendelse, at det ikke vilde være til nogensomhelst Nytte at fortsætte mine Forgængeres Diskussioner om Mulighederne, men at der nu maatte kræves afgjørende Forsøg; indtil disse kunde gives, vilde det være rigtigt at tie stille. Der gik flere Aar hen med de forberedende Arbejder. Først maatte jeg udarbejde en Rendyrkningsmethode, saa at jeg med fuldstændig Sikkerhed kunde vide, om jeg arbejdede med eet eller med flere Species; jeg tog derfor mit Udgangspunkt fra Individet, fra een eneste Celle. Dernæst blev det min Opgave at udfinde Karakterer for de saaledes fremstillede Vegetationer og at behandle de indviklede Spørgsmaal om Species, Race og Varietet. Jeg har i Aarenes Løb behandlet disse Problemer fra forskjellige Synspunkter. De første Karakterer fandt jeg i Sporernes Udviklingsgang, særlig i Temperatur-Kardinalpunkterne. Det er nu almindeligt anerkjendt, at denne Analyse har stor Betydning i den nævnte Retning, og jeg har herpaa endvidere kunnet bygge en bekvem Methode til den praktiske Undersøgelse af Bryggerigjær. Af disse Grunde vedbliver jeg at lægge en særlig Vægt paa de Karakterer, som Sporernes Udviklingsgang give os, men jeg har ingensinde,

som overfladiske Læsere af mine Skrifter endnu jævnlig udtale, havt den Opfattelse, at disse Karakterer alene ere tilstrækkelige til at bestemme alle Arterne; tværtimod har jeg bestandig arbejdet paa at finde nye Kjendetegn og allerede givet en hel Række. (Det mikroskopiske Billede af Vegetationerne i Urtkultur; Hinderne; Vegetationerne paa fast Næringsbund; Forholdet til Sukkerarterne; Sporernes Spiring o. s. v.).

De saaledes berørte theoretiske Studier findes i mine »Undersøgelser over Alkoholgjærsvampenes Fysiologi og Morfologi«.

I Aarene 1882 og 1883 tilbød der sig to sjældent gunstige Lejligheder til i den store Praxis at prøve, hvad mine nye Vaaben duede til. Jeg tænker paa de Sygdomme, som da hjemsøgte Bryggerierne Tuborg og Gl. Carlsberg. Øllet i det første Bryggeri var angrebet af Gjærtykhed, i det sidste derimod af en Sygdom, som viste sig deri, at det fik en ubehagelig Lugt og styg, bitter Smag. Da det ikke var muligt at opdage nogen Fejl i Urten eller i den Maade, hvorpaa Gjæringen blev ført, maatte jeg nærmest antage, at Mikroorganismer vare Aarsagen. De Prøver, der bleve gjorte med Pasteurs Fremgangsmaade til Gjærens Rensning, bragte ingen Hjælp. Ved at sammenholde alle Iagttagelser kom jeg til den Forestilling, at Aarsagen til Sygdommen vistnok maatte søges i Paasætningsgjæren selv. Skjøndt jeg ved den mikroskopiske Undersøgelse ikke kunde opdage andre fremmede Organismer i Gjæren end nogle Bakterier, gik jeg dog ud fra den Ide, at de tilsyneladende ensartede Gjærceller vel kunde tilhøre flere Arter, og at det var nogle af disse, som havde fremkaldt Sygdommene. Fremgangsmaaden frembød sig af sig selv. Jeg maatte opløse Bryggerigjæren i sine Bestanddele, fremstille en stor Række Renkulturer deraf og endelig udføre Gjæringsforsøg, dels med hver Art for sig alene og dels med Blandinger af dem, vel at mærke paa en saadan Maade, at Forsøgene kom til at ligne Forholdene i Bryggerierne. Hvis den Forestilling, fra hvilken jeg var gaaet ud, var rigtig, maatte jeg paa denne Maade faa Kundskab om, hvilke af mine Renkulturer, der indeholdt god Bryggerigjær, og hvilke, der indeholdt Sygdomsgjær. En saadan Undersøgelse foretages nu med temmelig Lethed i ethvert gjæringsfysiologisk Laboratorium; men den Gang var der adskillige Vanskeligheder at overvinde. Siden den Tid har Tekniken paa dette Omraade netop udviklet sig i høj Grad.

Forsøgene viste, at de omtalte Sygdomme blive fremkaldte af Gjærarter, som ere helt forskjellige fra de to Kulturarter, som vare tilstede i Overvægt i de to Bryggeriers Paasætningsgjær, og

som hver for sig alene gave godt Øl. Som de følgende Afsnit vise, gives der et ikke ringe Antal Arter, ved hvis Indvirkning lignende Sygdomme som de nævnte kunne fremkomme. Om alle disse Sygdomsgjærarter gjælder det, at de ved flere Kjendetegn tydeligt adskille sig fra Bryggerigjærarterne. Nøjagtige Experimenter have endvidere lært os, at Sygdomsgjærarterne komme udenfra ind i Driften, og at de ikke ere Udviklingsformer af Bryggerigjæren.

Siden det er lykkedes mig at faa Rendyrkningen indført i Bryggerierne, har der i Praxis selv været en gunstig Lejlighed til at gjøre vigtige Iagttagelser i forskjellig Retning. Paa de to Bryggerier Gamle og Ny Carlsberg har jeg nu i Løbet af en lang Aarrække studeret denne Dyrkning af ren Gjær i det Store. Ingensinde viste der sig noget Tegn til, at Bryggerigjærarterne kunde udvikle Gjærformer som de omtalte, der foraarsage Sygdomme; men de vedbleve tværtimod under Bryggeriforholdene at bevare deres Artsmærker. Theorierne om Gjærens Udarten og Omdannelse have altsaa i den Henseende vist sig at være aldeles urigtige.

Som alle Organismer ere selvfølgelig ogsaa Bryggerigjærarterne underkastede Variationer. Saalænge de befinde sig under Bryggeriforhold, vise de dog, som allerede berørt, kun smaa Afændringer, og disse ere af flygtig Natur. Se vi dem fra Biologens Standpunkt, ere vi nærmest tilbøjelige til at betegne dem som helt ubetydelige; for den praktiske Brygger stiller Sagen sig derimod anderledes. Disse Omdannelser kunne nemlig vise sig paa en ubehagelig Maade og undertiden foraarsage en følelig Forstyrrelse. Som en Bølgegang bevæge de sig gjennem Driften i Aarets Løb; om Aarsagen have vi i de fleste Tilfælde ikke en Gang nogen Anelse. Spørgsmaalet om Gjærarternes Variation har saaledes ikke blot en stor theoretisk, men en ligesaa stor praktisk Interesse. En Oversigt over de experimentelle Undersøgelser, som jeg i den Retning indtil 1890 havde udført, findes i Kapitlet »Ueber die Variation« i mine »Untersuchungen aus der Praxis der Gärungsindustrie«. 1. Heft. Zweite Ausgabe. München 1890. Disse Studier blive uafbrudt fortsatte her paa Laboratoriet. En nærmere Omtale deraf vil dog ikke være paa sin Plads i denne Afhandling, der skal handle om Sygdomme. De Forstyrrelser, som foraarsages af Bryggerigjæren selv, kunne vi nemlig ikke opfatte som Sygdomme, idetmindste ikke i den Forstand, hvori vi her have taget dette Ord, og hvori det hidtil er blevet brugt i Literaturen.

I de følgende Afsnit beskrives mine Forsøg over Sygdomme, fremkaldte af Alkoholgjærsvampe, og nogle Undersøgelser, som staa

i Forbindelse dermed. Ved de talrige Arbejder, som krævedes hertil, have D'hrr. Assistenter Cand. polyt. Gram og Cand. pharm. Nielsen med megen Iver været mig behjælpelige.

---

**Gjærtykhed i Øl, fremkaldt af Saccharomyces ellipsoideus II og Sacch. Pastorianus III.**

Da jeg i Aarene 1882 og 1883 begyndte mine Studier over denne Sygdom, hørte den til de mest frygtede, ikke blot i Danmark, men i endnu højere Grad i Tydskland. Det var den Gang ikke sjældent, at den foraarsagede Undergjærings-Bryggerierne store Tab. Som vi foran have hørt, mente man en Tid lang, at det var en fremmed Gjærsvamp, Sacch. exiguus, der fremkaldte Sygdommen; senere hyldede man derimod den Opfattelse, at den havde sin Grund deri, at den almindelige Bryggerigjær selv, Sacch. cerevisiæ, degenererede, saa at den, istedetfor at udvikle store, vægtfyldige Celler, dannede smaa, lette.

I Bryggeriet Tuborg ved Kjøbenhavn yttrede denne Sygdom sig paa følgende Maade. Strax efterat det angrebne Øl i de kolde Lagerkjældere efter Lagringens Slutning var blevet aftappet, var det klart og tilsyneladende fejlfrit, men naar det i de Foustager eller Flasker, hvori det blev aftappet, i Løbet af nogle faa Dage havde været udsat for en højere Temperatur end den, der fandtes i Lagerkjælderen, f. Ex. blot for almindelig Stuevarme, saa dannede der sig et mere eller mindre rigeligt Gjærbundfald, som ved en endog temmelig ringe Bevægelse i Vædsken gjorde denne plumret. Naar Sygdommen var stærkt udviklet, blev Øllet, som var angrebet deraf, allerede et Par Dage efter Aftapningen saa stærkt gjærtykt, at det slet ikke kunde drikkes.

De Undersøgelser, som jeg i den Anledning anstillede, bleve offentliggjorte 1883 i Laboratoriets Tidsskrift. For Oversigtens Skyld meddeles i det nærmest Efterfølgende de vigtigste Resultater deraf, og derpaa følge de nye Forsøg, som jeg i de senere Aar har udført.

I. Forsøgsrække. — Af det syge Øl fra det omtalte Bryggeri udskilte jeg de Alkoholgjærsvampe, som fandtes deri, og erholdt paa denne Maade tre Arter, nemlig en Art, henhørende til Gruppen Sacch. cerevisiæ (Hovedbestanddelen af Bryggeriets Undergjær), og to vilde Gjærarter, som jeg har indført i Literaturen under Navn af Sacch. Pastorianus III og Sacch. ellipsoideus II[1]). Min Op-

[1]) En Beskrivelse af disse og de i det Følgende omhandlede Arter findes paa forskjellige Steder i mine »Undersøgelser over Alkohol-

gave var derefter at afgjøre, om Sygdommen skyldtes nogen af de to sidstnævnte Arter. I den Hensigt anstillede jeg først en Række Experimenter ved Hjælp af 6 tohalsede Pasteurske Kolber, hvoraf hver indeholdt 700 Kub.-Centim. af den samme steriliserede Urt. Til 2 af Kolberne, der vare mærkede A, blev derpaa til hver sat $1^1/_4$ Kub.-Centim. af den omtalte Sacch. cerevisiæ, og til hver af 2, mærkede B, 1 Kub.-Centim. af samme Bryggerigjærart og desuden $^1/_4$ Kub.-Centim. af Sacch. ellipsoideus II; til hver af 2, mærkede C, 1 Kub.-Centim. ligeledes af den ofte nævnte Bryggerigjær og $^1/_4$ Kub.-Centim. af Sacch. Pastorianus III. Den anvendte Gjær var i alle Tilfælde tykflydende og i den Henseende nogenlunde ens; den var avlet i Renkulturer under samme Forhold og bestod af unge, kraftige Celler. Hovedgjæringen foregik ved almindelig Stuevarme; Eftergjæringen under Lagringen fandt Sted ved c. 7° C. Til Lagringen blev der ligeledes benyttet tohalsede Kolber; disse bleve stærkt fyldte med vedkommende Øl. Efterat dette havde været lagret c. 3 Maaneder, blev det aftappet paa andre steriliserede Kolber, som derpaa bleve henstillede i et Skab ved almindelig Stuevarme. Det viste sig da, at Øllet fra B og C blev aldeles gjærtykt efter mindre end 8 Døgns Henstand, medens Øllet fra A endnu efter 14 Døgns Forløb intet fejlede. Heraf fremgik altsaa, at den ene af de tre Gjærarter i det syge Øl, nemlig Sacch. cerevisiæ, gav et holdbart Produkt, naar den var ene tilstede i den gjærende Vædske; men at Sygdommen derimod indtraadte, saasnart en af de to andre Arter, ligemeget hvilken, blev blandet sammen med den under de nævnte Omstændigheder.

Saavel i dette som overhovedet i alle de Forsøg, der efterhaanden bleve udførte for at udfinde ikke blot nærværende, men ogsaa andre Sygdommes Natur, blev der naturligvis sørget for, at de til samme Række hørende Gjæringer stemte nøjagtig overens i alle Forhold med Undtagelse af den Forskjel i Paasætningsgjærens Sammensætning, om hvis Indvirkning Spørgsmaalet drejede sig. Der blev selvfølgeligt ogsaa bestandigt arbejdet med absolute Renkulturer.

Med forskjellige Variationer anstillede jeg i Laboratoriet et temmelig stort Antal Forsøg over Gjærtykhedsfænomenerne; navnlig

gjærsvampenes Fysiologi og Morfologi«. I en overskuelig Form ere de sammenstillede i Jørgensens Bog: »Die Mikroorganismen der Gärungsindustrie«, 3te Ausgabe, Berlin, 1892, og i Zopf's Haandbog: »Die Pilze«, Breslau, 1890.

bleve de ogsaa udførte med andre Ølgjærformer end den nævnte fra Tuborg Bryggeri. Resultatet blev det samme. Ved at udvide Undersøgelserne havde jeg tillige erholdt den interessante Oplysning, at de to Sygdomsgjærarter ikke fremkalde Sygdommen, naar de først bleve satte til Øllet ved Hovedgjæringens Slutning, altsaa paa det Stadium, da Lagringen begynder.

Disse Forsøg bleve nu gjentagne med større Maal. Der stilledes de samme Spørgsmaal som tidligere; desuden ønskede jeg at erholde Oplysninger om, hvor store Mængder af Sygdomsgjær, der maa være tilstede i Paasætningsgjæren, hvis Sygdommen skal kunne træde frem, og endelig, hvilken Indflydelse en ringere eller stærkere Attenuation i Hovedgjæringen, samt en kortere eller længere Lagringstid, maatte udøve.

Som Exempel paa de Forsøg, hvilke jeg med disse Spørgsmaal for Øje anstillede, meddeles her de nedenstaaende.

II. Forsøgsrække. — I hvert af to Pasteurske Gjæringskar, A og B, blev der anbragt 165 Liter luftet Urt (13,5 % Ball.), som den benyttes i Bryggeriet til almindeligt Lagerøl. Til A blev der sat 660 Gr. tykflydende Ølgjær af den Art, som jeg senere har beskrevet under Navn af Carlsberg Undergjær Nr. 1; til det andet Kar, B, 644 Gr. af den samme Gjær og desuden 16 Gr. ligeledes tykflydende Gjær af Sacch. ellipsoideus II. Vegetationerne af de to Gjærarter vare unge, kraftige og avlede under de samme Vilkaar. Urtens Temperatur, da Gjæren blev sat til, var 7° C., Rummets Temperatur under Hovedgjæringen 7—10° C. Efter 8 Døgns Henstand var Extraktmængden i A 7,6, i B 7,5 % Ball. Fra hvert af Karrene blev da en Foustage paa 66 Liter fyldt med vedkommende Øl og derpaa lagt ned i en Lagerkjælder, hvis Temperatur var 2° C. Den øvrige Del af Øllet blev derpaa overladt til fortsat Gjæring. Efterat denne ialt havde varet 10 Døgn, var Extraktmængden saavel i A som i B 6,7 % Ball. Øllet blev derpaa aftappet paa Foustager og ligesom de første Portioner lagt ned i den nævnte Lagerkjælder.

Da de to første Portioner Øl, hvis Extraktmængde ved Lagringens Begyndelse var c. 7,5 % Ball., havde tilbragt 2⅓ Maaned i Lagerkjælderen, bleve de aftappede paa rene, klare Flasker af farveløst Glas, som derpaa bleve stillede ind i et mørkt Skab i Laboratoriet. Strax efter Aftapningen vare ligesom i de tidligere Forsøg begge Ølsorter uden Spor af Gjærtykhed, men allerede efter 1 Døgns Henstand kunde man skimte en begyndende Gjær-

udvikling i B. Efter 5 Døgns Forløb var den sidstnævnte tydeligt gjærtyk, A derimod ikke.

De sidste Foustager, hvis Extraktmængde var 6,7 % Ball., da de bleve bragte ned i Lagerkjælderen, bleve efter 3 Maaneders Forløb behandlede aldeles som foran beskrevet. Øllet saavel af B som af A var imidlertid fuldstændigt holdbart; dets Extraktmængde var nu 5,9 % Ball.

Denne Forsøgsrække lærte os altsaa, at Sygdommen endnu kan indtræde, naar Sacch. ellipsoideus II kun udgjorde 1/41 af Paasætningsgjæren, men kun naar Øllet blev ført i Lagerkjælderen med en Extraktmængde af mindst 7,5 % Ball., og hvis Lagringen under disse Forhold afbrydes efter 2 1/3 Maaneds Forløb. Fortsattes derimod Gjæringen i Gjæringskjælderen, saa at Extraktmængden indskrænkedes til 6,7 %, og lagrede man dette Øl mindst i 3 Maaneder, saa viste Sygdommen sig ikke.

Dette Forsøg blev gjentaget, men med den Forandring, at der til Paasætningsgjæren til Karret B blev sat 1/41 af Sacch. Pastorianus III istedetfor af Sacch. ellipsoideus II. Hovedresultatet blev det samme, dog viste det sig saavel i dette som ogsaa i nogle andre Forsøg, at sidstnævnte Gjærart var den værste af de to.

Endelig blev der ogsaa anstillet Forsøg med store Maal over den Indflydelse, det har, naar Infektionen først finder Sted ved Hovedgjæringens Slutning.

III. Forsøgsrække. — Hertil blev der benyttet saavel Lagerøl som Exportøl fra Bryggeriet Gl. Carlsbergs Gjæringskjælder paa det Stadium, da Øllet skulde føres i Lagerkjælderen. Af hver Ølsort blev der fyldt tre Foustager, A, B, C, hver paa 16 1/2 Liter. B blev derpaa inficeret med 10 Kub.-Centim. Gjær af Sacch. ellipsoideus II og C med 10 Kub.-Centim. Gjær af Sacch. Pastorianus III; de med A mærkede bleve ikke inficerede, men tjente som Kontrol. Gjæren var tykflydende og bestod, ligesom i alle de hidtil omtalte Forsøg af unge, kraftige Vegetationer, der vare avlede i Urtkulturer. Da Forsøget saaledes var sat i Gang, bleve Foustagerne lagte ned i Bryggeriets Lagerkjælder og her lagrede paa sædvanlig Vis i henved 2 1/2 Maaned, altsaa en forholdsvis meget kort Lagringstid for Exportøllets Vedkommende. Temperaturen var 2° C. Det viste sig da, at dette stærkt inficerede Øl i alle Retninger var fortrinligt, og at det havde en ligesaa stor Holdbarhed som det ikke inficerede. Resultatet blev altsaa ogsaa i dette Tilfælde det samme som ved Forsøgene med de smaa Maal i Laboratoriet.

De ovenstaaende Forsøg ere beskrevne i min foran nævnte Afhandling fra 1883. Jeg skal nu gaa over til at give nogle Meddelelser om de Undersøgelser, som jeg siden den Tid har anstillet over den her studerede Sygdom.

De Forsøg, der bleve udførte i de store Pasteurske Gjæringskar, stemme saa nøje overens med Forholdene i Bryggerierne, at jeg ingen Betænkelighed havde ved at overføre de vundne Resultater paa de praktiske Forhold. De eneste Indvendinger, der kunde rejses derimod, ere, at disse Gjæringskar ere forskjellige fra de i Bryggerierne sædvanligt anvendte derved, at de ikke tillade Kulsyren at slippe bort med den Lethed, som det sker under de normale Bryggeriforhold. Endvidere var Temperaturen i det Lokale, i hvilket mine Kar stode, lidt højere, end den plejer at være i Bryggeriernes Gjæringskjælder. Det var mig derfor meget kjært, da Bryggeridirektør, Kapt. Kühle godhedsfuldt overlod mig en Afdeling af Gjæringskjælderne paa Gl. Carlsberg til mine nye Forsøg. For den viste Imødekommenhed udtaler jeg ogsaa offentligt herved min bedste Tak. Fra nu af bleve alle mine praktiske Undersøgelser forinden deres Afslutning underkastede en Prøve i Bryggeriet. Laboratorieforsøgene med de smaa Maal kunne i Virkeligheden kun tjene som en foreløbig Vejledning, og man kan ikke uden videre fra disse slutte sig til, hvad der vil ske i Driften under de store, praktiske Forhold. Naar man udfører saadanne Forsøg i selve Bryggeriet, maa man naturligvis anvende den største Omhu og Forsigtighed derved; kun da kan det ske uden at udsætte Driften for Fare.

IV. Forsøgsrække. — I den nævnte Gjæringskjælder blev der opstillet tre Kar, A, B og C; de vare af Træ og havde samme Form som almindelige Gjæringskar. I hvert blev der anbragt 1 Td. ($1^1/_3$ Hektoliter) Urt til Lagerøl, 14 % Ball.

| | | | |
|---|---|---|---|
| Til A blev der sat | 400 Gr. | Carlsberg Undergjær Nr. 2. | |
| - B - - - | 350 Gr. | — — — | og |
| | 50 Gr. | Sacch. Pastorianus III. | |
| - C - - - | 350 Gr. | Carlsberg Undergjær Nr. 2 | og |
| | 50 Gr. | Sacch. ellipsoideus II. | |

Urtens Temperatur, da Gjæren blev sat til, var $7{,}5^0$ C. Efter 8 Døgn var Extraktmængden i A $8{,}13$; i B $8{,}21$ og i C $8{,}29$ % Ball. Klaringen i A var god, i B og C kun temlig god. Øllet fra hvert Kar blev derpaa aftappet paa to ligestore Foustager, som bleve spundsede og lagte ned i en Lagerkjælder, hvis Temperatur var $^1/_2$—$2^1/_2{}^0$ C.

Da Øllet havde tilbragt 1 Maaned paa dette Sted, var det i alle Tilfælde klart og havde Udseende og Smag som godt, normalt Øl, der gaar i Handelen. Fra hver Foustage blev der paa den foran omtalte Maade aftappet et større Antal Flasker, som derpaa bleve henstillede i et mørkt Skab ved almindelig Stuevarme.

Efter 8 Døgn var Øllet af A fremdeles klart, uden kjendeligt Bundfald, medens Øllet af B og C havde udviklet et temligt stærkt Gjærbundfald, som ved Rystning gjorde Vædsken uklar.

Den i dette Forsøg benyttede Bryggerigjærart hører til dem, der efter en kort Lagring give klart Øl med en fyldig Smag, men med en temlig ringe Holdbarhed.

Da Flaskerne havde staaet 12 Døgn, begyndte der ogsaa i Øllet af A at vise sig et tydeligt Gjærbundfald, men Øllet af B og C var dog langt stærkere angrebet i den Henseende.

Det samme Hovedresultat gav et lignende Forsøg med Carlsberg Undergjær Nr. 1 og de to Sygdomsgjærarter. I dette Tilfælde blev dog Lagringen fortsat 1 Maaned længere. Ligesom i tidligere Forsøg opnaaede det Øl, der blev gjæret med denne Bryggerigjær, en meget større Holdbarhed end det, der var gjæret med Carlsberg Undergjær Nr. 2.

Som det var at vente, fremkaldte de to vilde Gjærarter altsaa ogsaa Sygdommen, naar Gjæringen blev ført i Bryggeriet selv og under de der herskende Forhold. Sacch. ellipsoideus II var den værste af de to Arter.

Vi have nu tilbage at undersøge, hvad der sker med Øllet, naar det først efter endt Lagringstid kommer i Berøring med de to Arter, altsaa i de smaa Foustager og i Flaskerne, i hvilke det aftappes for at sendes til Kunderne.

Til disse Forsøg benyttede jeg Halvflasker af klart, farveløst Glas og af den Størrelse og Form, som de almindelig bruges til Aftapning af Øl i Handelen; hver Flaske rummede c. 350 Kub.-Centim. Efterat de vare rensede, bleve de saavel som de tilhørende Propper steriliserede. Paafyldningen af Øllet blev udført med stor Omhu. Derpaa bleve de Portioner af de to Sygdomsgjærarter, hvis Virkning skulde undersøges, indførte, og Flaskerne nøjagtigt proppede. Naar dette var sket, bleve de godt rystede og tilsidst stillede ind i et mørkt Rum ved almindelig Stuevarme. Infektionen var i alle Tilfælde rigelig, men dog bestandig afpasset saaledes, at Øllet strax efter Rystningen vedblev at være klart. Ogsaa de ikke inficerede Flasker, som bleve henstillede til Kontrol sammen med de andre, bleve naturligvis rystede ligesom disse og i alle Henseender behandlede paa samme Maade som de, kun

med den Forskjel, at de ikke bleve inficerede. Der blev forøvrigt ved disse ligesom ved de tidligere Forsøg lagt Vægt paa at efterligne Forholdene, som de findes i Praxis. Øllet stammede fra Bryggeriet Gl. Carlsberg og var almindeligt Lagerøl; kun i nogle faa Tilfælde benyttede jeg Øl fra nogle af mine egne Gjæringer med Renkulturer af Bryggeri-Undergjær. Det sidstnævnte Øl sluttede sig i sin kemiske Sammensætning nær til det omtalte Lagerøl, der indeholdt 4,3 % Alkohol og 5,6 % Extrakt.

Som en Prøve paa de Undersøgelser, der bleve udførte med de ovenfor angivne Spørgsmaal for Øje, meddeles de nedenstaaende Forsøg.

V. Forsøgsrække. — Unge, kraftige Vegetationer af de to Sygdomsgjærarter, som vare blevne avlede i almindelige Urtkulturer, bleve i temlig tyndflydende Tilstand anvendte til at inficere 12 Flasker Lagerøl. Til hver af 3 Flasker blev der sat 1 Draabe af Sacch. Pastorianus III og til hver af 3 Flasker 3 Draaber af den samme Gjærart; 6 Flasker bleve paa lignende Maade inficerede med Gjær fra Sacch. ellipsoideus II; 3 ikke inficerede Flasker tjente som Kontrol.

Efter 10 Døgns Henstand vare alle endnu klare, uden kjendeligt Bundfald.

4 Døgn senere forholdt Kontrolflaskerne sig paa samme Maade. I Flaskerne, som vare blevne inficerede med Sacch. Pastorianus III, fandtes et ringe Bundfald, som bevirkede, at Vædsken, naar den blev rystet, blev sløret. Flaskerne med den anden Sygdomsgjærart havde paa dette Tidspunkt udviklet et stærkere Bundfald; de 3, som hver havde modtaget 1 Draabe, bleve ved Rystning svagt gjærtykke, og de 3, som hver havde modtaget 3 Draaber, stærkt gjærtykke.

VI. Forsøgsrække. — 24 Flasker bleve inficerede, Halvdelen fra hver Art. Gjæren var avlet i Flasker med Lagerøl, som havde staaet en halv Snes Døgn ved almindelig Stuevarme, og som hyppigt vare blevne rystede for at fremskynde Formeringen; den bestod af en kraftig Vegetation og blev anvendt i temlig tyndflydende Tilstand. Med Sacch. Pastorianus III bleve 4 Flasker inficerede, hver med 1 Draabe, 4 hver med 2 Draaber, 2 hver med 4 Draaber og 2 hver med 8 Draaber. Paa lignende Maade bleve 12 Flasker inficerede med Gjær fra Sacch. ellipsoideus II; 3 Flasker tjente som Kontrol.

Da Flaskerne havde staaet 7 Døgn, fandtes kun et kjendeligt Bundfald i de 2, som hver havde modtaget 8 Draaber af Sacch.

ellipsoideus II; Vædsken i disse blev, efterat være bleven rystet, svagt sløret; alle de øvrige Flasker vare klare, uden Bundfald.

Efter 14 Døgns Henstand vare Kontrolflaskerne og de 10 Flasker af dem, der vare blevne inficerede med Gjær af Sacch. Pastorianus III, fuldstændigt klare og uden kjendelig Gjærudvikling; de 2 Flasker, som hver havde modtaget 8 Draaber af denne Gjærart, vare ligeledes klare, men ved nøje Eftersyn iagttoges et meget ringe Bundfald i dem; ved Rystning blev Øllet dog kun lidt sløret. De 4 Flasker, der hver havde modtaget 1 Draabe af Sacch. ellipsoideus II, forholdt sig som Kontrolflaskerne; de øvrige fremviste derimod efter Infektionens Styrke svagere og stærkere Tegn til Gjærtykhed. Efter Omrystningen bleve dog kun de Flasker tydeligt gjærtykke, som vare blevne stærkest inficerede (4 og 8 Draaber).

Nogle Forsøgsrækker, der bleve udførte paa den samme Maade som de to foregaaende, men med Bærme, fik væsentligt det samme Udfald. Denne Bærme stammede fra nogle af de Lagerfade, der ere omtalte i Beskrivelsen af de Forsøg, i hvilke de to Sygdomsgjærarter sammen med Paasætningsgjæren bleve satte til Urten ved Hovedgjæringens Begyndelse. De Celler, der i disse Forsøg bleve indførte i Flaskerne, vare altsaa avlede under Bryggeriforhold i Gjærings- og i Lagerkjælderen. De vare mindre kraftige end i de foregaaende Tilfælde, og heri søger jeg Aarsagen til, at Virkningen blev noget svagere.

Ogsaa i Forsøgene over den Indflydelse, som Infektionen faar, naar den først finder Sted paa det Stadium, da Lagerøllet aftappes paa Flaskerne for at gaa ud til Kunderne, viste det sig altsaa, at Sacch. ellipsoideus II var den kraftigste af de to Sygdomsgjærarter. Vi erfarede endvidere, at Infektionen fik større Virkning, naar den bestod af unge, kraftige Celler, der i Løbet af nogle faa Dage vare avlede i Urt, end naar den bestod af Vegetationer, som stammede fra en langvarig Gjæring. For at Sacch. Pastorianus III skulde kunne gjøre sig gjældende under disse Forhold, maatte der til Flaskeøllet sættes saa store Mængder deraf, at jeg ikke kan tænke mig, at den i Praxis paa dette Punkt kan faa nogen Virkning. Den anden Art forholder sig, som sagt, noget anderledes. Naar den til Infektionen anvendte, tyndflydende Gjær bestod af unge, kraftige Celler, var det nemlig tilstrækkeligt at sætte 1 Draabe deraf til hver Flaske for at bevirke, at Øllet efter 14 Døgn blev gjærtykt, medens Øllet i Kontrolflaskerne holdt sig omtrent 3 Uger. En stærkere Infektion

fremkaldte hurtigere Gjærtykhed. Denne Art vil altsaa ogsaa paa dette Punkt i Praxis kunne fremkalde Forstyrrelser. En stærk Luftning af Øllet under Aftapningen og en daarlig Propning af Flaskerne fremmer Udviklingen af de vilde Gjærceller. Øl, som er svagt forgjæret og rigt paa Extrakt, er ogsaa mere udsat for Smitten end andet Øl. Dette gjælder om Øllet saavel ved Lagringens Begyndelse som ved dens Slutning. Den ringe Infektion, Luftens Støv ved Aftapningen kan føre med sig, vil i den Henseende ingen Betydning kunne faa. Naar Øl, som er godt, medens det befinder sig i Lagerfadene, bliver angrebet af den her omhandlede Sygdom efter Aftapningen, da hidrører dette, ifølge det Foregaaende, derfra, at Flaskerne og Transportfadene ikke have været tilbørlig rensede. En ringe Infektion i det aftappede Lagerøl faar ingen Virkning; endog af Sacch. ellipsoideus II maa Infektionen være forholdsvis stærk for at gjøre sig gjældende.

Hvad der er sagt om Infektion af Lagerøllet paa Flasker, vil ogsaa i alt Væsentligt have sin Gyldighed for det samme Øl, naar det er aftappet paa de smaa Transportfoustager.

Ogsaa fejlfrit Øl, som er gjæret med en Renkultur af en god Bryggerigjærart, vil efter en tilstrækkelig lang Henstand danne Gjærbundfald i de Flasker og Foustager, i hvilke det er blevet aftappet; det udvikler sig imidlertid, som vi have hørt, meget langsommere end det, der dannes af Sygdomsgjærarterne. Som Regel fandt jeg ogsaa, at der i de to Tilfælde var en tydelig Forskjel paa Beskaffenheden af Bundfaldet. Naar det gode Øl blev rystet, blev det dog ikke uigjennemsigtigt og plumret; Gjærlaget sønderdeltes nemlig i smaa Klumper og Brokker uden i kjendelig Grad at flyde ud i Vædsken, og disse Smaadele sank atter hurtigt til Bunds. Gjæren i det syge Øl laa derimod ikke fast, men ved en ringe Bevægelse i Vædsken steg en hel Sky af Celler op; naar saadant Øl blev rystet stærkt, blev det helt opfyldt med Mudder.

I intet af de talrige Forsøg, som jeg har anstillet med de to Gjærarter, iagttog jeg, at de havde meddelt Øllet en ubehagelig Smag og Lugt, ejheller i de Tilfælde, i hvilke de dog havde fremkaldt en udpræget Gjærtykhed. Fine Ølkjendere kunde vel paapege en Forskjel, men den traadte ikke frem som en Sygdom.

Forinden jeg slutter dette Kapitel, vil jeg her meddele nogle Iagttagelser om den ene af de deri omhandlede Sygdomsgjærarter, Sacch. Pastorianus III.

I et af mine tidligere Arbejder har jeg kortelig berørt nogle Iagttagelser, som jeg havde Lejlighed til at gjøre angaaende den

Betydning, det har, om Urten er luftet eller ikke, naar Gjæren sættes til. Ved at dyrke Carlsberg Undergjær Nr. 1 og Nr. 2 hver for sig i luftet Urt, erholdt jeg en Avl, som under Bryggeriforhold gav god normal Klaring. Bleve derimod de samme to Gjærarter dyrkede i en aldeles lignende, men ikke luftet Urt, saa erholdt jeg en Gjærvegetation, som først, efterat den havde gjennemgaaet flere Gjæringer i Bryggeriet, igjen formaaede at arbejde paa den normale Maade. Gjæren Nr. 2 vendte dog hurtigere tilbage til sin oprindelige Tilstand end Gjæren Nr. 1; begge vare blevne underkastede en foreløbig Omdannelse, men den ene i højere Grad end den anden.

Det Øl, som fremkom ved Gjæringen af den ikke luftede Urt, var i høj Grad opaliserende, og længere Tids Lagring hjalp i Reglen kun lidet i den Henseende; det vedblev at være uklart, ogsaa efterat Gjærcellerne havde bundfældet sig, og efterat det i Løbet af flere Dage havde været udsat for almindelig Stuevarme. Dette gjaldt især om det Øl, som blev gjæret med Carlsberg Undergjær Nr. 1. Den luftede Urt gav klart Øl, den ikke luftede uklart, opaliserende.

Anbragte jeg derimod i den ikke luftede Urt en Paasætningsgjær, som ikke blot bestod af en af de nævnte Undergjærarter, men hvortil jeg desuden havde sat en lille Portion af Sygdomsgjærarten, Sacch. Pastorianus III, blev Resultatet imidlertid et helt andet. I dette Tilfælde blev ogsaa Øllet af den ikke luftede Urt klart; Sygdomsgjærarten havde altsaa virket som et Lægemiddel.

Da jeg nogle Aar derefter gjentog disse Forsøg, blev Udfaldet et andet. Reglen var nu, at Øllet af den ikke luftede Urt ogsaa blev klart; dog bleve disse nye Forsøg anstillede ligesom de tidligere med Urt til almindeligt Lagerøl fra Gl. Carlsberg og med de samme Gjærarter. Nogle af Forsøgene bleve udførte i Laboratoriet ved Hjælp af Kolber paa 10 Liter, hvori der var anbragt 7 Liter af Urten, andre i en Gjæringskjælder under Bryggeriforhold. Lagringen fandt i alle Tilfælde Sted ved en Temperatur af 1—2° C. Jeg søgte overhovedet saa nøje som muligt at efterligne Forholdene i Praxis. Kun i et af disse nye Forsøg blev Øllet af den ikke luftede Urt opaliserende. Dette Forsøg blev anstillet i fire af de foran omtalte Kar i Gjæringskjælderen paa Gl. Carlsberg; i det første blev Gjæringen udført af Carlsberg Undergjær Nr. 1; i det andet af en Blanding af den og Sacch. Pastorianus III; i det tredie af Carlsberg Undergjær Nr. 2 og i det fjerde af en Blanding af denne med Sacch. Pastorianus III. Hovedresultatet var, at Øllet med Carlsberg Undergjær Nr. 2 kun var svagt opaliserende,

hvorimod Øllet med Carlsberg Undergjær Nr. 1 var stærkt opaliserende. Øllet af det Kar, i hvilket Gjæren bestod af Carlsberg Undergjær Nr. 2 og Sacch. Pastorianus III, var strax efter Aftapningen blankt, og Øllet af det fjerde Kar, i hvilket Gjæren bestod af Carlsberg Undergjær Nr. 1 og Sacch. Pastorianus III, var vel temmeligt stærkt opaliserende, men dog i meget ringere Grad end Øllet i det første Kar. Sacch. Pastorianus III havde altsaa havt den tidligere omtalte Virkning paa det opaliserende Øl.

Den rimeligste Forklaring af disse Svingninger er vel den, at den kemiske Sammensætning af de Urtmængder, hvormed jeg til de forskjellige Tider anstillede mine Experimenter, har været forskjellig. Disse Undersøgelser have i hvert Fald lært os, at Sacch. Pastorianus III, der under visse Omstændigheder kan optræde som en farlig Sygdomsgjærart, under andre derimod er i Stand til at virke som et Lægemiddel. De have endvidere vist os, at Urten kan have en saadan Beskaffenhed, at den ikke behøver at udsættes for den Luftning, som man plejer at anvende i Bryggerierne, og som hidtil blev anset for at være aldeles nødvendig til Opnaaelsen af en god Gjæring og et klart Øl. Om Luftningens Betydning er vor Viden endnu meget ringe, og en indgaaende Undersøgelse i den Retning vil derfor have stor Værdi. Ovenstaaende Bidrag har jeg meddelt her, fordi jeg ikke troer, at jeg nogensinde faar Lejlighed til at komme tilbage dertil.

Paa dette Sted, hvor der er Tale om Svingninger i Gjærarternes Virksomhed, kan jeg ogsaa meddele den Iagttagelse, at den samme Tilsætning af Sygdomsgjær i nogle af mine Forsøg fremkaldte meget stærke og i andre derimod kun meget svage Sygdomsfænomener; og dog syntes det, at Forsøgene i alt Væsentligt vare blevne udførte paa den samme Maade. Den Vexlen, der i Aarets Løb finder Sted i Urtens kemiske Sammensætning i det selvsamme Bryggeri, kan idetmindste for en Del være Skyld heri; en foreløbig Omændring i Cellernes Tilstand kan ogsaa tænkes at spille en Rolle. Vi staa overhovedet her overfor lignende Fænomener som dem, der saa hyppigt omtales i Literaturen om de pathogene Bakterier. I den Konkurrence, der finder Sted mellem Bryggerigjæren og Sygdomsgjærarterne, gjør Cellernes Tillempningsevne sig ogsaa efterhaanden mere og mere gjældende. Om dette sidste Spørgsmaal vil jeg i mine theoretiske Studier forhaabentlig komme til at meddele nogle Oplysninger.

**Hovedresultat.** — Vi have saaledes fulgt Øllet gjennem alle Gjæringens Stadier paa dets Vej fra Gjæringskarret til Lagerfadet og endelig derfra til Forbrugerne. Vore Undersøgelser have lært os, at det er de to Gjærarter Sacch. Pastorianus III og Sacch. ellipsoideus II, som fremkalde Sygdommen, naar de findes i Paasætningsgjæren og altsaa tilsættes Urten ved Hovedgjæringens Begyndelse. En af Forsøgsrækkerne viste, at Sygdommen endnu kan indtræde, naar Sygdomsgjæren kun udgjorde $^1/_{41}$ af Paasætningsgjæren, men at den under disse Omstændigheder dog kan holdes tilbage, naar der sørges for en stærk Forgjæring og en tilstrækkelig lang Lagringstid. Er der større Portioner af Sygdomsgjæren tilstede, bliver det vanskeligere og undertiden umuligt at forhindre Sygdommen i at bryde frem.

En Infektion, som først fandt Sted ved Hovedgjæringens Slutning, naar Øllet førtes i Lagerkjælderen, fik derimod ingen Virkning. Øl, som i ubesmittet Tilstand forlader Gjæringskjælderen, vil som Regel ikke faa Sygdommen, selv om det i Lagerfadene eller i Ledningerne dertil træffer de to Sygdomsgjærarter. Vi maa imidlertid vel erindre, at der foruden disse gives et stort Antal andre Mikroorganismer, som kunne fremkalde ligesaa farlige Forstyrrelser. En nøjagtig Rensning af Ledningerne til Lagerkjælderen og en hyppig Begning af Lagerfadene er og bliver derfor bestandig af den største Vigtighed.

Naar Infektionen ikke var stærk, fik den ingen Indflydelse paa godt Lagerøl, som var aftappet paa Flasker. Af Sacch. Pastorianus III kunde endog forholdsvis meget store Gjærmængder sættes til Øllet, uden at der indtraadte nogen Sygdom. Tilsætning af 1 Draabe tyndflydende Gjær af den anden Art til 350 Kub.-Centim. Lagerøl fremkaldte en svag Gjærtykhed; men kun, hvis Gjæren bestod af unge, kraftige Celler.

Hovedreglen er den, at de to Arter ere farlige ved Hovedgjæringens Begyndelse og egentlig kun paa dette Stadium. I alle Tilfælde har Sacch. ellipsoideus II vist sig at være den farligste af dem. Om de Svingninger, som den samme Infektion kan fremvise i sine Virkninger, er der talt i den foregaaende Fremstilling.

I de senere Aar ere begge disse Arter ogsaa blevne iagttagne af L a s c h e i Chicago og af K o k o s i n s k i i Lille. Disse Forskere have vist, at de optræde i nordamerikanske og franske undergjærede Ølsorter paa en lignende uheldbringende Maade som i de danske og tydske. Vi skulle i et af de følgende Afsnit stifte Bekjendtskab med andre Arter, som ligeledes fremkalde Gjærtykhed

i Øl. De to her omhandlede anser jeg imidlertid for at være særligt farlige i den Henseende, navnlig gjælder dette om Sacch. ellipsoideus II.

**Saccharomyces exiguus.**

Fra den ovenfor meddelte historiske Fremstilling erindres det, hvorledes man i de nærmeste Aar efter Fremkomsten af Reess's Undersøgelser over Alkoholgjærsvampene var tilbøjelig til at give Saccharomyces exiguus Skylden for de Forstyrrelser, der kunde indtræde i Gjæringen, naar Øllet ikke vilde klare, naar det efter Lagringen blev gjærtykt eller fik en ubehagelig Smag. Forsøg anstillede man som sagt ikke, men lod sig nøje med en simpel mikroskopisk Undersøgelse. De smaa Gjærceller, som man kunde finde i saadant daarligt Øl, bleve bestemte som hørende til Reess's Art, Sacch. exiguus, og denne fik saaledes uden videre Skyld for en hel Række forskjellige Ulykker. Man vidste den Gang ikke, at enhver Saccharomyces-Art kan udvikle Celler, der kunne henføres til den nævnte af Reess opstillede Art.

Vil man med den Viden, vi nu have, fremdeles anvende dette systematiske Navn, saa maa det nærmest knyttes til den Art, som jeg har omtalt i mine »Undersøgelser over Alkoholgjærsvampenes Forhold til Sukkerarterne« (se nærværende Tidsskrift II Bd. 5te H., 1888, p. 220). Med denne anstillede jeg nogle Forsøg, hvoraf de nedenstaaende meddeles som Exempel.

I. Forsøgsrække. — I hvert af 3 Kar, A, B, C, som vare opstillede i Gl. Carlsbergs Gjæringskjælder, blev der anbragt 1 Td. (1¹/₈ Hektoliter) Urt til Lagerøl, 14,3 % Ball. Karrene vare de i det foregaaende Afsnit omtalte Gjæringskar af Træ.

Til A blev der sat 400 Gr. Carlsberg Undergjær Nr. 2.
- B - - - 350 - — — — og
75 - Sacch. exiguus.
- C - - - 400 - Carlsberg Undergjær Nr. 2.

Gjæren bestod i alle Tilfælde af unge, kraftige Vegetationer, avlede ved c. 10° C., og var temmelig tykflydende. Urtens Varmegrad, da Gjæren blev sat til, var 7¹/₂° C. Gjæringskjælderens Varmegrad var under hele Forsøget 8—9° C.

Efter 7 Døgns Forløb var Extraktmængden i A 7,37; i B 7,45 og i C 7,21 % Ball. Klaringen var god i alle 3 Kar, Øllets Lugt og Smag ligeledes god og ens i alle.

Øllet fra hvert Kar blev fadet paa to ligestore Foustager. Til den ene Foustage med Øl fra C blev der sat 15 Gr. og til den

anden 30 Gr. tykflydende Gjær af Sacch. exiguus. Alle Foustagerne bleve derpaa spundsede og lagte ned i en Lagerkjælder, hvis Temperatur var $^1/_2$—$2^1/_2$ ° C.

Efter 3 Maaneders Lagring blev der tappet nogle Flasker Øl fra hver Foustage. Denne Aftapning foregik paa den i det foregaaende Kapitel angivne Maade, og Flaskerne bleve ligeledes stillede ind i et mørkt Skab ved almindelig Stuevarme. Øllet var strax efter Aftapningen i alle Tilfælde fuldstændigt klart og havde god Smag og god Lugt. Efter 15 Døgns Henstand var Øllet af A, B og C bestandigt ens og i enhver Henseende godt.

II. Forsøgsrække. — Fremgangsmaaden var den samme som i den foregaaende Forsøgsrække. Der blev imidlertid anvendt 6 Gjæringskar, A, B, C, D, E, F.

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Til A blev der sat | 400 | Gr. | Carlsberg Undergjær | Nr. 1. |
| - B - - - | 400 | - | — — | Nr. 2. |
| - C - - - | 350 | - | — — | Nr. 1 og |
| | 50 | - | Sacch. exiguus. | |
| - D - - - | 350 | - | Carlsberg Undergjær | Nr. 2 og |
| | 50 | - | Sacch. exiguus. | |
| - E - - - | 400 | - | Carlsberg Undergjær | Nr. 1. |
| - F - - - | 400 | - | — — | Nr. 2. |

Urtens Extraktmængde var 13,9 % Ball., dens Temperatur, da Gjæren blev sat til, var 7 ° C.

Hovedgjæringen blev afsluttet efter 10 Døgns Forløb. I A fandtes da 6,80; i B 7,78; i C 7,18; i D 7,70; i E 6,72 og i F 7,86 % Ball. Klaringen var i alle Tilfælde god, bedst i B og F. Øllets Lugt og Smag var for alle Kars Vedkommende væsentligt den samme. Til Øllet af E blev der paa samme Maade som i 1ste Forsøg sat 75 Gr. af Sacch. exiguus og til Øllet af F ligeledes en lignende Portion af den samme Gjærart.

Efter næppe 2 Maaneders Lagring indeholdt A 5,74; B 6,72; C 5,90; D 6,56; E 5,74 og F 6,64 % Ball. Øllet var da fuldstændigt klart, og aftappet paa Flasker, som foran beskrevet, havde det efter 11 Døgns Henstand kun dannet et meget ringe Bundfald. Der var tilmed i den Henseende ingen Forskjel paa det med Sacch. exiguus inficerede og paa det ikke inficerede Øl. Alle Ølprøverne havde god Lugt og god Smag; endnu efter 14 Døgn viste der sig ikke i noget Tilfælde Tegn til Sygdom.

Efter 3 Maaneders Lagring var Extraktmængden i A 5,74; i B 6,39; i C 5,82; i D 6,39; i E 5,74 og i F 6,31 % Ball. Ligesom sidst var Øllet i alle Tilfælde fuldstændigt klart og havde god

Smag og god Lugt. Efter 14 Døgns Henstand paa Flasker under de foran omtalte Forhold fandtes intet Tegn til Gjærtykhed eller til nogensomhelst anden Sygdom.

I de beskrevne Forsøg blev Sacch. exiguus i nogle Tilfælde sat til Urten sammen med den normale Paasætningsgjær, det vil sige ved Hovedgjæringens Begyndelse, i andre derimod først ved Hovedgjæringens Slutning paa det Tidspunkt, da Lagringen begyndte. Foruden disse udførte jeg ogsaa nogle Infektionsforsøg med den nævnte Gjærart saaledes, at den først blev sat til Øllet ved Lagringens Slutning. Fremgangsmaaden var den samme som i de tilsvarende Forsøg med Sacch. Pastorianus III og Sacch. ellipsoideus II, der ere omtalte i det foregaaende Kapitel. Jeg anvendte hertil dels en ung, kraftig Vegetation, som var avlet i i Kolber med Urt, dels Bærme, som ved Lagringens Slutning blev tagen fra det i de to netop beskrevne Forsøgsrækker fremstillede Øl, og dels endelig Gjærbundfald, der havde dannet sig i Flasker med sædvanligt Lagerøl, der var blevet inficeret med Sacch. exiguus, og derefter havde staaet lang Tid i Værelset. For at fremskynde Formeringen vare disse Flasker hyppigt blevne omrystede. Den saaledes paa forskjellig Maade avlede Gjær blev benyttet i tyndflydende Tilstand; i nogle Forsøgsrækker blev der sat 2, i andre 3 Draaber til hver af de Flasker med Lagerøl, som bleve anvendte til Prøven. Skjøndt Infektionen altsaa var betydelig, fik den dog ingen kjendelig Virkning; thi efter 14 Døgns Henstand viste endnu ingen af Flaskerne noget Tegn til Gjærtykhed.

**Hovedresultat.** — Af disse Forsøg ses altsaa, at endog en stærk Tilsætning af Sacch. exiguus ved Hovedgjæringens Begyndelse, ved dens Slutning eller ved Lagringens Slutning ikke fremkalder nogensomhelst Sygdom i Lagerøllet. Da Forsøgene bleve anstillede aldeles under de Forhold, der findes i Driften, kunne Resultaterne ogsaa overføres med fuld Gyldighed paa Praxis.

Det er ikke muligt at afgjøre, hvad det egentlig har været for Gjærceller, hvorpaa man har tænkt i den Periode, da Sacch. exiguus spillede en saa stor Rolle i den zymotekniske Literatur. Siden man har begyndt at underkaste Sygdommene i Øl, fremkaldte af Alkoholgjærsvampe, en experimentel Behandling, har der ikke været Tale om denne Gjærart. Umuligt er det naturligvis ikke, at man en Dag kan opdage en Sygdomsgjærart med smaa Celler, som man med lidt god Villie kan henføre til Reess's gamle Art

Sacch. exiguus; men for Øjeblikket er dette Skræmmebillede forsvundet fra Zymoteknikens Omraade.

Foruden den her af mig omtalte Sacch. exiguus gives der, som jeg allerede ved andre Lejligheder har fremhævet, flere andre vilde Gjærarter, der vel kunne udvikle en yppig Vegetation i Ølurt, men som dog ikke fremkalde nogen Sygdom i Øllet. Det samme gjælder ogsaa om flere Bakterier.

Mine ovenfor beskrevne Forsøg bleve kun udførte med de deri stillede praktiske Spørgsmaal for Øje, og fra den Side set viste det sig altsaa, at en Tilsætning af Sacch. exiguus ingen Indflydelse fik. Hvis vi fra theoretiske Synspunkter ville forfølge dette Konkurrenceforhold i dets Enkeltheder, saa ville vi dog finde, at Indvirkningen af Sacch. exiguus ikke har været sporløs. I flere af Forsøgene iagttog jeg f. Ex., at en stærkere Tilsætning af denne Art bevirkede, at Attenuationen paa Gjæringens første Stadier skred langsommere frem, end naar Bryggerigjærarterne vare ene tilstede.

---

**Ubehagelig Lugt og Smag i Øl, fremkaldt af Sacch. Pastorianus I.**

Det i denne Overskrift angivne Hovedresultat meddelte jeg i nogle faa Linier i 1884 i »Zeitschrift für das ges. Brauwesen«, idet jeg lovede senere at give en udførligere Redegjørelse for mine Undersøgelser. Denne fremlægges nu i det Efterfølgende tilligemed nye Forsøg.

I den berørte foreløbige Meddelelse omtalte jeg, at Øllet paa Gl. Carlsberg i 1883 var blevet angrebet af en Sygdom, som bestod deri, at det fik en ubehagelig, bitter Smag og ilde Lugt. Nogle Ølkjendere betegnede denne Smag og Lugt tillige som røgagtig; alle vare enige, at Øllet havde taget Skade. Ved at opløse Gjæren i sine Bestanddele lykkedes det mig at udskille fire Saccharomycesarter deraf. I de Forsøg, som jeg derpaa anstillede med dem i Kolber med Urt, gav kun den ene af dem Øl med god Smag og god Lugt; det er den Art, som jeg har betegnet med Navnet Carlsberg Undergjær Nr. 1, og som siden den Tid efter en stor Maalestok anvendes i de skandinaviske Bryggerier. Iblandt de andre fandtes den Art, som jeg har kaldt Sacch. Pastorianus I. K u n  n a a r  d e n n e  v a r  t i l s t e d e  i  P a a s æ t n i n g s g j æ r e n,  f r e m k o m  S y g d o m m e n. Ihvor overbevisende end saadanne Forsøg, som anstilles i Laboratoriet, kunne være, saa have de dog ikke den Beviskraft som de, der udføres i Bryggeriet selv under de der herskende Forhold; i det Følgende beskrives derfor kun disse sidste.

I. Forsøgsrække. — Tre af de foran omtalte smaa Gjæringskar, C, D, E, bleve opstillede i Gjæringskjælderen paa Gl. Carlsberg og hver forsynet med 1 Td. (1⅓ Hektoliter) almindelig, luftet Urt til Lagerøl, 13,8 % Ball. Urtens Temperatur, da Gjæren blev sat til, var 7,8° C. Kjælderens Temperatur var 5—6° C.

Til C blev der sat 500 Gr. Sacch. Pastorianus I.
- D - - - 400 Gr. Carlsberg Undergjær Nr. 1 og
100 Gr. Sacch. Pastorianus I.
- E - - - - 500 Gr. Carlsberg Undergjær Nr. 1.

Gjæren var i alle Tilfælde tykflydende, og den var avlet i en Urt som den foran nævnte ved 8—10° C.

Efter 11 Døgn fandtes i C 6,03, i D 5,54; i E 6,27 % Ball. Øllet blev da aftappet paa tre smaa Foustager fra hvert Kar og lagt ned i Lagerkjælderen. Dennes Temperatur var 2—3° C. C og D havde ubehagelig Lugt og bitter, ubehagelig Smag, E derimod god Lugt og god Smag; den bittre Smag var stærkest fremtrædende i C. Uagtet der havde fundet en stærk Forgjæring Sted, vedblev Klaringen i C og D dog at være slet; i E var den derimod god.

Efter omtrent 1 Maaneds Lagring blev der fra det ene Sæt af Foustagerne paa sædvanlig Maade taget Prøver i hvide Halvflasker. C var fuldstændigt uklart, D næsten klart og E fuldstændigt klart. Allerede efter 5 Døgns Henstand ved almindelig Stuevarme var D svagt gjærtykt, medens E endnu efter 12 Døgn intet fejlede i den Henseende. Det Øl, i hvis Gjæring Sacch. Pastorianus I havde taget Del, havde den ovenfor omtalte ubehagelige Smag og Lugt i høj Grad, medens det tilsvarende Øl, som udelukkende var gjæret med Carlsberg Undergjær Nr. 1, havde den samme gode Smag og Lugt som Gl. Carlsbergs sædvanlige Lagerøl.

Da Øllet havde tilbragt lidt over 2 Maaneder i Lagerkjælderen, vare D og E fuldstændigt klare, C endnu gjærtyk. I C fandtes 5,54; i D 5,37; i E 5,29 % Ball. I Henseende til Smagen og Lugten var der endnu den samme Forskjel tilstede som tidligere. Øllet af D var nu ogsaa blevet holdbart; ligesom Øllet af E stod det paa Flasker i Værelset i 21 Døgn uden at vise noget Tegn til Gjærtykhed.

Efter 5 Maaneders Lagring havde Øllet af D fremdeles i høj Grad den ubehagelige, bittre Smag. Øllet af C var da endnu ikke klart; dette skete først, da det havde tilbragt 6 Maaneder i Lagerkjælderen; den stygge Smag var den samme som tidligere.

Det samme Hovedresultat erholdes, naar man udfører Forsøgene med en Sammenblanding af Sacch. Pastorianus I og en anden Bryggerigjærart end Carlsberg Undergjær Nr. 1.

Den omtalte Sygdom traadte altsaa stærkt frem, naar 1/5 af Paasætningsgjæren bestod af Sacch. Pastorianus I. I et Forsøg, som jeg anstillede ved Hjælp af store Pasteurske Kar, i hvert af hvilke der var anbragt 1 1/3 Hektoliter luftet Urt af samme Beskaffenhed som den foran omtalte, viste det sig imidlertid, at Sygdommen ogsaa indtraadte, naar kun 1/11 af Paasætningsgjæren udgjøres af den nævnte Sygdomsgjærart. Dette Forsøg blev imidlertid ikke anstillet aldeles under Bryggeriforhold, og jeg skal derfor ikke dvæle længere derved, men strax gaa over til at beskrive de nedenstaaende.

II. Forsøgsrække. — Den blev udført paa samme Maade som den første og i den samme Gjæringskjælder. Urten indeholdt i dette Tilfælde 13,9 % Ball; dens Temperatur var 7° C., da Gjæren blev sat til.

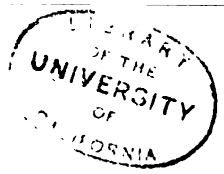
| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Til | A | blev | der | sat | 400 Gr. Carlsberg Undergjær Nr. 1. |
| - | E | - | - | - | 380 Gr. — — — og |
| | | | | | 18 Gr. Sacch. Pastorianus I. |
| - | F | - | - | - | 380 Gr. Carlsberg Undergjær Nr. 1 og |
| | | | | | 18 Gr. af en Varietet af Sacch. Pastorianus I[1]). |

I E og F udgjorde Sygdomsgjæren altsaa 1/22 af den hele Paasætningsgjær.

Efter 10 Døgn fandtes i A 6,80; i E 7,37; i F 7,86 % Ball. Klaringen i A var god, i E og F kun temmelig god. I Henseende til Smagen og Lugten bemærkedes ikke nogen fremtrædende Forskjel hos Øllet i de tre Kar.

Da Øllet havde tilbragt omtrent 2 Maaneder i Lagerkjælderen, fandtes i A 5,74; i E 6,15 og i F 6,23 % Ball; det var i alle Tilfælde klart. A havde den sædvanlige gode Smag og Lugt, E og F derimod ubehagelig Lugt og bitter, styg Smag,

1) Med en typisk Vegetation af Sacch. Pastorianus I som Udgangspunkt har jeg ved en bestemt Dyrkningsmaade fremstillet en hel ny Form, som jeg foreløbig har betegnet som en Varietet. Den udmærker sig navnlig derved, at den fuldstændig har mistet Evnen til at danne Sporer og Hinde. En Oversigt over de Resultater, som mine Studier over Gjærarternes Omdannelse havde bragt indtil 1890, findes i Kapitlet »Ueber die Variation« i mine »Unters. aus der Praxis der Gärungsindustrie«, I Heft. Zweite Ausg.






men kun i meget ringe Grad. Denne Prøve blev foretagen strax efter Aftapningen og som sædvanlig af flere Personer, der havde Forstand paa Øl. Da Øllet havde staaet paa Flasker nogle Dage i Værelset, blev Prøven gjentaget, Forskjellen syntes da at være endnu mindre fremtrædende. Det var overhovedet kun ved at foretage en Sammenligning med det ikke inficerede Øl, at det var muligt at udfinde de Flasker, som indeholdt Øl, der delvis var gjæret med Sacch. Pastorianus I og dens Varietet. Efter 6 Døgns Henstand fandtes i Flaskerne med Øllet fra E og F et temligt stærkt Bundfald af Gjær, og ved Rystning blev det gjærtykt. Øllet af A var derimod holdbart.

Nye Prøver toges efter 3 Maaneders Lagring; A indeholdt da 5,74; E og F 5,9 % Ball. Øllet var i alle Tilfælde klart. Angaaende Smagen og Lugten blev der gjort de samme Iagttagelser som sidst. Efter 14 Døgns Henstand paa Flasker i Mørke ved almindelig Stuevarme fandtes i A endnu intet kjendeligt Bundfald, og ved Rystning viste der sig intet Tegn til Gjærtykhed. I Øllet fra E og F havde derimod et tydeligt Bundfald af Gjær udviklet sig, og ved Rystning blev det svagt gjærtykt.

Den ubehagelige Smag og Lugt viste sig altsaa ogsaa i dette Tilfælde, omend i en meget ringe Grad. Ovenfor have vi hørt, at disse Sygdomsfænomener derimod give sig tilkjende paa en meget fremtrædende Maade, naar der findes større Mængder af Sacch. Pastorianus I i Paasætningsgjæren. At dette ogsaa gjælder om dens Varietet, overbevistes jeg om ved direkte Forsøg.

I de beskrevne Forsøg blev Sygdomsgjæren sat til Urten ved Hovedgjæringens Begyndelse; de efterfølgende Forsøg bleve derimod anstillede for at erfare, hvorledes Forholdene stille sig, naar Infektionen først sker ved Hovedgjæringens Slutning.

III. Forsøgsrække. — Da Hovedgjæringen i den foran beskrevne I. Forsøgsrække var sluttet, og Øllet fra Gjæringskarrene aftappet paa de smaa Lagerfade, blev der taget 20 Kub.-Centim. af Bundgjæren i hvert af Karrene C, D og E, og derpaa overført i hver sin Otting (c. 17 Liter), der var fyldt med gjærende Urt (Lagerøl) paa det Stadium, da det efter fuldendt Hovedgjæring føres ned i Lagerkjælderen. Disse smaa Lagerfade bleve forøvrigt behandlede, som det er omtalt i de foregaaende Kapitler, og tilligemed en Kontrolfoustage, der var fyldt med ikke inficeret Øl, lagte ned i den ofte omtalte Lagerkjælder. Dens Temperatur var 3—6° C. Naar man erindrer, at den Vægtmængde af saadan tykflydende Gjær, som idetmindste i de kjøbenhavnske Bryggerier i Almindelighed anvendes som Paasætningsgjær, er 4 Gr. pr. Liter Urt, saa ses

det, at den omtalte Infektion var meget stærk. C indeholdt, som ovenfor meddelt, udelukkende Sacch. Pastorianus I, D en Blanding af denne Sygdomsgjærart og Carlsberg Undergjær Nr. 1, og E kun den sidstnævnte Bryggerigjærart; i alle Tilfælde havde de, som berørt, gjennemgaaet en Hovedgjæring i Gjæringskjælderen. Forholdene lignede altsaa i alle Henseender fuldstændigt dem, der kunne findes i Praxis.

Da dette Øl havde tilbragt 2¼ Maaned i Lagerkjælderen, blev der paa den foran beskrevne Maade aftappet et større Antal Flasker fra hver Foustage. Øllet var i alle Tilfælde fuldstændigt klart, uden Bundfald.

De Ølkjendere, som foretoge Smagsprøven, vare i Almindelighed tilbøjelige til at erklære alle Foustagers Indhold for godt; kun i Flaskerne fra C, hvor den hele Mængde af Infektionen bestod af Sacch. Pastorianus I, fandt de fleste dog et Spor af den ubehagelige, bittre Smag. Infektionen havde altsaa i den Henseende havt liden eller slet ingen Virkning; det Samme gjaldt om Øllets Holdbarhed. Efterat Flaskerne havde staaet 21 Døgn ved almindelig Stuevarme, frembøde endnu ingen af dem, noget Tegn til Gjærtykhed.

IV. Forsøgsrække. — Fremgangsmaaden var den samme som i den foregaaende. Øllet var af den samme Beskaffenhed og befandt sig paa det samme Stadium af Gjæringen, altsaa ved Lagringens Begyndelse. Til hver Otting blev der imidlertid i dette Tilfælde sat 10 Kub.-Centim. temlig tyndflydende Gjær af en ung, kraftig Vegetation af Sacch. Pastorianus I, som var avlet ved 1 Døgns Kultur i Urt. Lagerkjælderens Temperatur var 2,5° C.

Efter omtrent 3 Maaneders Lagring var saavel det inficerede som det ikke inficerede Øl klart, uden Bundfald, da det var aftappet paa Flaskerne; Smagen og Lugten var i begge Tilfælde god. Ogsaa i Henseende til Holdbarhed var der ikke nogen Forskjel; efter 14 Døgns Henstand under de foran omtalte Omstændigheder viste der sig nemlig endnu intet Tegn til Gjærtykhed.

Som Exempel paa de Forsøg, der bleve udførte for at udfinde, hvilken Virkning Infektionen maatte have, naar den først fandt Sted ved Lagringens Slutning, meddeles de nedenstaaende.

V. Forsøgsrække. — 9 Flasker med Lagerøl bleve inficerede, 3 hver med 1 Draabe Gjær af Sacch. Pastorianus I, 2 hver med 3 Draaber og 4 hver med 1 Kub.-Centim. Gjæren bestod af en ung, kraftig Vegetation fra en Urtkultur og var meget tyndflydende.

3 ikke inficerede Flasker tjente til Kontrol. Fremgangsmaaden var forøvrigt den ovenfor beskrevne.

Flaskerne, der bleve inficerede hver med 1 eller 3 Draaber, viste efter 14 Dages Forløb endnu intet Tegn til Gjærtykhed, og deres Øl havde den samme gode Smag og Lugt som ved Forsøgets Begyndelse; de forholdt sig kort sagt som Kontrolflaskerne.

De 4 Flasker, som havde modtaget den overordentligt stærke Tilsætning af 1 Kub.-Centim. hver, vare allerede efter 4 Døgn gjærtykke, men deres Øl havde desuagtet kun modtaget en svag Antydning af den bittre Smag.

VI. Forsøgsrække. — Da Øllet i II. Forsøgsrække var aftappet af de Foustager, i hvilke det havde tilbragt omtrent 2 Maaneder i Lagerkjælderen, blev der af den temmelig tyndflydende Bærme i E (Carlsberg Undergjær Nr. 1 og Sacch. Pastorianus I) sat 1 Draabe til hver af 3 Flasker med Lagerøl. I dette Tilfælde bestod Gjæren altsaa af en Vegetation, som havde tilbagelagt saavel Hoved- som Eftergjæringen under Bryggeriforhold. Som Kontrol blev der henstillet 3 Flasker med ikke inficeret Lagerøl. Efter 16 Døgns Henstand havde Infektionen endnu ikke vist nogen Virkning, hverken hvad Smagen, Lugten eller Holdbarheden af Øllet angik.

VII. Forsøgsrække. — 16 Flasker Lagerøl bleve inficerede; 3 ikke inficerede tjente som Kontrol. Til Infektionen blev benyttet det Bundfald, som havde dannet sig i Øl, der havde staaet lang Tid paa Flasker ved almindelig Stuevarme. Dette Øl var i det ene Tilfælde gjæret med en Sammenblanding af Carlsberg Undergjær Nr. 1 og Sacch. Pastorianus I og i det andet med den nævnte Bryggerigjærart i Forening med den foran nævnte Varietet af Sacch. Pastorianus I. Disse Gjærformer havde ikke blot gjennemgaaet Hovedgjæringen i Gjæringskjælderen og den normale Eftergjæring i Lagerkjælderen, men derefter tillige en ny Eftergjæring og ny Celleformering i det aftappede Øl. Fra enhver af de to Gjærblandinger bleve 8 Flasker inficerede, 3 hver med 1, 3 hver med 2, 1 med 4 og 1 med 8 Draaber af Gjæren i temmelig stærkt fortyndet Tilstand.

Flaskerne, som havde modtaget 8 Draaber hver, begyndte at blive gjærtykke efter 7 Døgn, de, som hver havde modtaget 4, naaede dette Standpunkt efter 12 Døgn, medens de, som kun havde modtaget 1 eller 2 Draaber hver, i de fleste Tilfælde endnu efter 14 Døgn vare fejlfrie; i det Højeste viste de kun en svag Antydning af

en begyndende Gjærtykhed; de havde kort sagt væsentligt den samme Holdbarhed som Kontrolflaskerne. I Henseende til Lugten og Smagen iagttoges ingen Forskjel imellem det inficerede og det ikke inficerede Øl.

**Hovedresultat.** — Den ubehagelige Lugt og stygge, bittre Smag, som den i dette Afsnit behandlede Sygdom meddeler undergjæret Lagerøl, gav sig ikke blot tilkjende i det færdigt lagrede Øl, men ogsaa allerede i den gjærende Urt ved Hovedgjæringens Slutning. Forsøgene viste, at denne Sygdom skyldes Sacch. Pastorianus I og den Varietet, som jeg har fremstillet af denne Gjærart. Sygdommen optraadte egentligt kun, naar Infektionen fandt Sted ved Hovedgjæringens Begyndelse. Det er i Paasætningsgjæren og i Urten i Gjæringskarrene, at man maa søge Kimene. Naar $^1/_5$ af Paasætningsgjæren udgjordes af Sacch. Pastorianus I, optraadte Sygdommen i en udpræget Grad; ved at formindske Tilsætningen blev den mindre fremtrædende; den kunde endnu netop spores, naar denne Gjærart eller dens Varietet udgjorde $^1/_{32}$ af den hele Paasætningsgjær. Under de foran beskrevne Omstændigheder synes Grændsen dermed at være naaet. En endnu ringere Tilsætning vil altsaa næppe faa nogen skadelig Virkning i den nævnte Retning. I et Forsøg med en stærk Infektion viste det sig, at Øllet ogsaa efter en saa lang Lagringstid som 5 Maaneder vedblev at beholde den derved foraarsagede stygge Smag og Lugt.

At ogsaa Øl, som udelukkende var gjæret med en Renkultur af denne Art eller af dens Varietet, maatte faa den samme stygge Smag og Lugt, var let at forudse.

Hvis Infektionen først finder Sted i Lagerfadene eller i Ledningerne paa Vejen dertil, saa faar den under de sædvanlige Bryggeriforhold ingen Virkning. Dette viste de Forsøg, der bleve anstillede dels med unge, kraftige Vegetationer, avlede i Urt efter 1 Døgns Kultur, dels med saadanne Vegetationer, som i Forening med en Bryggerigjærart havde fuldendt en Hovedgjæring i et Gjæringskar i Bryggeriet. Kun i et Forsøg, i hvilket en overordentlig stor Portion af en Renkultur af Sacch. Pastorianus I blev sat til Øllet ved Lagringens Begyndelse, fik dette en svag Antydning af den ubehagelige, bittre Smag.

En Infektion af Øllet efter Lagringens Slutning fik i den Henseende en ligesaa ringe Virkning.

Det er imidlertid ikke blot paa Øllets Smag og Lugt, at Sacch. Pastorianus I kan indvirke paa en uheldbringende Maade,

men dette gjælder ogsaa om Øllets Holdbarhed. I de Forsøg, i hvilke den var tilstede i Paasætningsgjæren, foraarsagede den endvidere, at Klaringen ved Hovedgjæringens Slutning blev daarligere end ellers. Allerede naar Sacch. Pastorianus I kun udgjorde $^1/_{22}$ af Paasætningsgjæren, bevirkede den, at det dermed gjærede Øl efter normal Lagring i kjendelig Grad blev mindre holdbart end det tilsvarende Øl, som var gjæret med en Renkultur af Bryggerigjæren. Ligesom i de foran beskrevne Forsøg med Sacch. ellipsoideus II og Sacch. Pastorianus III spiller Øllets Forgjæring og Lagring ogsaa her en vigtig Rolle. Det stærkt forgjærede Øl i første Forsøgsrække blev, da det havde tilbragt 2 Maaneder i Lagerkjælderen, fuldstændig holdbart, skjøndt $^1/_5$ af dets Paasætningsgjær bestod af Sacch. Pastorianus I. Naar Forgjæringen under Hovedgjæringen er stærk og Øllet derefter underkastes en ikke for kortvarig Lagring i en god Kjælder, saa vil det som Regel kunne undgaa at blive angrebet af Gjærtykhed efter Aftapningen. Er den her omhandlede Sygdomsgjærart tilstede i en større Mængde, ville, som vi foran have hørt, disse Forholdsregler dog ikke kunne forhindre den i at angribe Øllet paa en anden Maade, nemlig ved at fordærve dets Smag og Lugt.

Med Hensyn til den Virkning, som denne Gjærart udøvede, iagttoges forøvrig lignende Svingninger som de, der kortelig ere berørte i Kapitlet om Sacch. Pastorianus III og Sacch. ellipsoideus II.

I de Tilfælde, i hvilke Infektionen først fandt Sted, efterat Øllet havde forladt Gjæringskjælderen, altsaa under Lagringen eller efter dennes Afslutning, havde den, hvad Øllets Holdbarhed angaar, ingen Indflydelse, hvis der ikke blev sat forholdsvis meget store Mængder af Sygdomsgjæren til.

Om der altsaa i Lagerfadene, i Ledningerne til disse eller i de Flasker og smaa Foustager, i hvilke Øllet sendes til Kunderne, findes lidt af Sygdomsgjæren, faar ingen Betydning, hverken i den ene eller i den anden Retning; det er ved Hovedgjæringens Begyndelse, at Faren er tilstede. Heri er der altsaa Overensstemmelse med de Hovedresultater, som mine foran meddelte Undersøgelser over Sacch. ellipsoideus II og Sacch. Pastorianus III bragte.

---

De Meddelelser, som jeg i 1883 og 1884 udgav om Sygdomsgjærarterne, bragte paany dette Spørgsmaal frem paa Dagsordenen og paa en anden Maade end tidligere. Der blev nu i de fleste gjæringstekniske Laboratorier foretaget lignende Forsøg som de,

jeg havde beskrevet i de nævnte Meddelelser. Experimenternes Tid paa dette Omraade var hermed begyndt.

I mine første Studier indskrænkede jeg mig til at undersøge, hvilken Virkning en Infektion ved Hovedgjæringens Begyndelse havde, og jeg lod foreløbig de øvrige Stadier af Gjæringen være ude af Betragtning. Den samme Fremgangsmaade have de Forfattere fulgt, der senere have beskjæftiget sig med Studier over Alkoholgjærsvampenes Forhold til Øllets Sygdomme. En Oversigt over de Resultater, som disse Arbejder have bragt, vil her have sin Interesse og skal derfor meddeles i det Efterfølgende.

I 1887 offentliggjorde Grønlund en udførlig Undersøgelse over lignende Sygdomsfænomener som dem, jeg netop har omtalt (Zeitschrift für das ges. Brauwesen X Jahrg.). Han meddelte, at i et dansk Undergjærings-Bryggeri havde Øllet, der ellers var holdbart og velsmagende, i den sidstnævnte Henseende taget Skade. Øllet var nu ikke blot blevet bittert, men det efterlod tillige, naar man havde drukket det, en højst ubehagelig, bidende og sammensnærpende Smag. I dette syge Øl fandt han en Gjærart, som var i Besiddelse af alle de af mig for min Sacch. Pastorianus I opstillede Karakterer, og han bestemte den derfor som dènne Art. Ved direkte Forsøg viste han endvidere, at det var den, der fremkaldte Sygdommen.

De Undersøgelser, som senere bleve anstillede af Kokosinski i Lille og af Lasche i Chicago, bekræfte ligeledes Rigtigheden af mine Forsøg.

Vi lære heraf ikke blot, at Sacch. Pastorianus I er meget udbredt i Bryggerierne, men tillige, at denne Art under saa forskjellige Forhold som dem, der findes i de nævnte Landes Bryggerier, dog fremkalder den omtalte frygtede Sygdom.

I »Berichte der wissenschaftlichen Station für Brauerei in München pro 1885—88« og i »Zeitschrift für das ges. Brauwesen«, 1891, meddeler Will en Række indgaaende Undersøgelser, som han har anstillet med to nye Saccharomyces-Arter. Den ene af disse bevirkede, at undergjæret Øl fik en ejendommelig, sødlig Smag med en kradsende, bitter Eftersmag, og at Klaringen under Eftergjæringen foregik langsommere, end naar Øllet var fri for disse Celler. Virkningen af den anden Art var hovedsagelig den samme. Begge høre til de for Fabrikationen af undergjæret Øl farlige Arter.

Ogsaa fra Bryggeristationen i New-York foreligger der i den nyeste Tid Meddelelser af Krieger om vilde Gjærarter, der bevirke,

at Øllet bliver mindre holdbart og samtidig dermed faar en styg Smag.

I »Wochenschrift für Brauerei«, 1889, beskriver Windisch nogle Gjæringsforsøg med forskjellige Bryggerigjærarter og med en ikke nærmere beskreven Art af Gruppen Sacch. Pastorianus. De bleve udførte i Kolber med steriliseret Ølurt. Øllet, som var gjæret med den sidstnævnte vilde Gjærart, naaede ikke at blive blankt, og det havde en ubehagelig, bitter Smag med en kradsende Eftersmag.

Sammesteds, men i Aargangen 1891, meddeler P. Lindner, at han har iagttaget en Gjærart, der i høj Grad ligner en Bryggeri-Undergjærart. Efter Gjæringens Udseende, efter Klaringen og Bundgjærens Beskaffenhed, vilde den praktiske Brygger opfatte den som en udmærket Undergjær, men desuagtet frembringer den et Øl med en afskyelig, bitter og kradsende Smag. Denne farlige Gjærart havde indsneget sig i et af Berlins Bryggerier og her efterhaanden saaledes bredet sig i Paasætningsgjæren, at Øllet snart begyndte at faa den nævnte stygge Smag. Dette er ikke blot et nyt Exempel paa, hvor mangfoldige og farlige Sygdomsgjærarterne ere, men tillige paa, hvor ringe Betydning, hvor ringe Sikkerhed, der ligger i de Karakterer, hvorefter Bryggerne tidligere udelukkende, og desværre endnu efter en altfor stor Maalestok bedømme Gjæringens Gang og Tilstand.

Ogsaa Lasche har iagttaget nye Sygdomsgjærarter. En Beskrivelse deraf kan ventes i Chicago-Stationens Tidsskrift.

De foregaaende Undersøgelser ere alle knyttede til det undergjærede Øl. Gjennemgaar man imidlertid den engelske Bryggeriliteratur fra de senere Aar, saa finder man deri flere Iagttagelser, som vise hen til, at de vilde Gjærarter kunne fremkalde ligesaa store Forstyrrelser i Overgjærings- som i Undergjærings-Bryggerierne. Fra De Bavay i Melbourne foreligger en experimentel Undersøgelse, som viser, at den Sygdom, som i Australien kaldes »summer cloud«, skyldes en Saccharomyces (The Brewers Journal, London 1889, p. 490). Det overgjærede Øl, som er angrebet af denne vilde Gjærart, bliver uklart og faar en syrlig, bitter Smag. Denne Sygdom omtales som en af de største Ulykker for Bryggerne i dette Land.

---

**Hvorfra komme Sygdomsgjærarterne?**

Ved Undersøgelser som de foreliggende bliver det ikke blot vor Opgave at udforske, hvad Aarsagen til Sygdommen er, men vi stille strax derpaa nye Spørgsmaal: Hvorpaa kunne vi kjende Sygdomskimene? Hvor have de deres Arnesteder, og hvorledes snige de sig ind i Driften?

Om de Karakterer, ved hvilke Sygdomsgjærarterne kunne skjelnes fra de gode Bryggerigjærarter, har jeg givet Oplysning i mine ovenfor nævnte theoretiske Undersøgelser. Det vigtige Spørgsmaal om Arnestederne kunne vi desværre endnu ikke fuldstændig besvare. Jeg skal her i al Korthed meddele, hvad vi for Øjeblikket vide derom.

I 1881 offentliggjorde jeg i Laboratoriets Tidsskrift, I Bd. 3 H., en Afhandling om Saccharomyces apiculatus og dens Kredsløb i Naturen. Mine Undersøgelser viste ikke blot, at denne Gjærsvamp findes almindeligt paa modne, søde, saftige Frugter, men de gave tillige den vigtigere Oplysning, at disse Frugter ere dens normale Opfostringssted. Efterhaanden som Havens Frugter af den nævnte Slags tage til, fostres der talrige Generationer af dens Celler, og Luftens Støv bliver nu ogsaa rigere og rigere paa dem. Sacch. apiculatus iagttages regelmæssigt først paa de tidligst modne søde, saftige Frugter og derefter paa de senere modne. I Carlsbergs Have begynder den saaledes Sæsonen med Jordbærrene, Stikkelsbærrene og Kirsebærrene og slutter den med Blommerne og Vindruerne. Med Regnen og med nedfaldende Frugter bringes den ned i Jorden. Paa tørre Dage føres den med Jordens Støv atter op i Luften, og de Celler, som da aflejres paa de nævnte Frugter og her finde Adgang til disses Saft, kunne saaledes ved Knopskydning udvikle nye Generationer. Alt dette kan gjentage sig flere Gange i Sommerens Løb, saa at Sacch. apiculatus snart vandrer fra Frugterne ned i Jorden og snart fra denne tilbage til Opfostringsstederne. Den overvintrer i Jorden, og næste Sommer begynder den det samme Kredsløb paany. Selv kan den ikke forlade sit Vinteropholdsted, men maa have Hjælp dertil; i tørre Perioder hvirvler Blæsten den op med Jordens Støv; Regnen kan pidske den op paa lave Planter, f. Ex. Jordbærplanter; Insekter og andre Smaadyr kunne ligeledes spille en Rolle i den Retning. Kommer den da paa et Sted, hvor der er Næring for den, saa begynder den Knopskydningen, hvis ikke, vil den paa Grund af Udtørring hurtig gaa til Grunde.

I en lille Afhandling, som jeg i 1882 offentliggjorde i »Tidsskrift for populære Fremstillinger af Naturvidenskaben«, meddelte

jeg Resultatet af de Undersøgelser, som jeg i Mellemtiden havde anstillet angaaende den Del, Bierne, Hvepsene og Fluerne tage i Udbredelsen af den lille Gjærsvamp. Jeg fremhævede, at det i Frugttiden især er ved disse Insekters Hjælp, at den i levende Tilstand føres til Punkter, der ligge langt borte fra de oprindelige Arnesteder. Naar de nævnte Insekter komme i Berøring med de Safter, i hvilke Vegetationer af Sacch. apiculatus have udviklet sig, ville ofte store Mængder af Gjær fastklæbes i deres Haarklædning og her langsomt indtørre. Cellerne kunne, som mine Forsøg have vist, paa den Maade bevare deres Liv i længere Tid, end naar de i Luftens Støv blive spredte enkeltvis omkring. I det sidste Tilfælde vil Udtørringen nemlig som Regel være stærkere.

Dette var de Resultater, som mine foran nævnte Studier bragte. Havens søde, saftige Frugter viste sig at være de normale Arnesteder for den lille Gjærsvamp og Jorden dens normale Vinteropholdssted[1]). Mine Forsøg havde altsaa vist, at Insekter og andre Smaadyr vel ere virksomme ved Udbredelsen af denne Gjærarts Celler, men at ogsaa Vinden i den Henseende spiller en meget vigtig Rolle. Det er dette sidste Transportmiddel, som især har Krav paa Bryggeriernes Opmærksomhed, naar Talen er om Mikroorganismer.

Sacch. apiculatus er til Dato den eneste Gjærart, hvis Kredsløb i Naturen er kjendt. Mine Forsøg paa ogsaa at bringe Klarhed over dette Spørgsmaal med Hensyn til de egentlige Saccharomyceter (Gjærceller med Endosporedannelse, hvilken, som det erindres, Sacch. apiculatus mangler) have hidtil ikke ført til Maalet. Vor Viden om de for Gjæringsindustrien vigtigste Arter er i den Henseende fremdeles mangelfuld.

Allerede de Forskere, som først begyndte at studere Gjærcellerne, have iagttaget, at de findes paa de søde, saftige Frugter, især paa saadanne, der ere beskadigede, og at de her formere sig. Ogsaa mine talrige Undersøgelser have vist, at dette er almindeligt, navnlig danne de nedfaldne Frugter yppige Opfostringssteder for dem.

Om Vingjærsvampene udtaler Pasteur den Opfattelse, at de ikke overvintre i Jorden. Herimod gaa dog mine Undersøgelser. Jeg har nemlig fundet dem i levende Tilstand i Jorden under Vinrankerne paa flere Steder i Tydskland, saavel i Foraars- som i

[1]) Nye Undersøgelser over Sacch. apiculatus har jeg offentliggjort i »Botanisches Centralblatt«, Bd. XXI, Nr. 6, 1885; i »Annales des sciences naturelles. Botanique«, Tom. XI, Nr. 3, 1890, og i »Annales de micrographie«, 1890.

Sommermaanederne, altsaa paa en Tid, da der endnu ingen modne Druer fandtes. Der er megen Sandsynlighed for, at de af mig iagttagne Gjærceller ere blevne førte ned i Jorden det foregaaende Efteraar, da Druerne vare modne, og da de beskadigede Bær fostrede endeløse Generationer af saadanne Gjærceller. Nogen Sikkerhed for, at det forholder sig saaledes, kunne disse Undersøgelser dog ikke give. Ved direkte Forsøg har jeg imidlertid vist, at Celler af forskjellige Saccharomyces-Arter, som jeg i September Maaned anbragte i Jorden, vare levende efter et Aars Forløb, altsaa fra den ene Frugttid til den anden. De første Forsøg, som jeg i den Retning anstillede, ere beskrevne i Laboratoriets Tidsskrift 1882 p. 398; mine senere Forsøg findes i de foran omtalte Afhandlinger. Iblandt disse Saccharomyces-Arter fandtes ogsaa en typisk Vingjærsvamp, som jeg i 1883 har beskrevet under Navnet Sacch. ellipsoideus I, og den foran omtalte Sygdomsgjærart Sacch. Pastorianus I.

Det er altsaa sikkert, at idetmindste nogle af Saccharomyces-Arterne kunne overvintre i Jorden[1]), og ligeledes, at de søde, saftige Frugter frembyde en gunstig Næringsbund for dem. Om Jorden er deres normale Opholdssted om Vinteren og Foraaret og de nævnte Frugter deres normale Arnesteder om Sommeren og Efteraaret, vide vi dog ikke. De foreliggende Iagttagelser berettige os nemlig ikke uden- videre til at drage en saadan Slutning. Hertil hører der nemlig lignende experimentelle Beviser som de, mine Undersøgelser over Sacch. apiculatus's Kredsløb bragte; men saadanne er det, som sagt, endnu ikke lykkedes mig at give. Paa det Punkt, hvortil Undersøgelserne ere naaede, maa vi endnu bestandig indrømme, at der foreligger den Mulighed, at de ægte Saccharomyceter i Naturen kunne have andre Arnesteder og andre Overvintringssteder end de nævnte, og saadanne, som maaske have større Betydning end disse. Vi møde her atter det gamle Spørgsmaal, om Saccharomyceterne ere selvstændige Organismer eller kun Udviklingsformer af højere Svampe. Ifald det sidste skulde vise sig at være Tilfældet, maatte vi da naturligvis ogsaa tage Hensyn til disse Stamformer; ja, det var jo muligt, at netop de havde den aller-

[1]) I en Meddelelse om Vingjærsvampenes Overvintring (1890) slutter Müller-Thurgau sig til den af mig fremsatte Opfattelse. Paa et Punkt har han imidlertid, som det Foregaaende viser, misforstaaet mine Afhandlinger, idet han nemlig gaar ud fra, at det er min Mening, at Gjærcellernes Udbredelse kun finder Sted ved Vindens Hjælp.

største Værdi til Forstaaelsen af Problemet. Disse rent theoretiske Undersøgelser faa, fra den Side set, altsaa ogsaa en praktisk Interesse. Uagtet flere af de berømteste Forskere have gjort de mest energiske Anstrængelser for at finde disse formentlige Stamformer, er der dog hidtil ikke opdaget noget Spor af dem. I den nyeste Tid er det som bekjendt navnlig Brefeld, der atter har henledet Opmærksomheden paa dette Spørgsmaal. Resultatet for Øjeblikket er, at vi fremdeles maa regne med Saccharomyceterne som selvstændige Organismer.

Af de foregaaende Undersøgelser fremgaar det, at Luftens Støv til alle Aarets Tider kan indeholde Celler af ægte Saccharomyceter, deriblandt ogsaa af Sygdomsgjærarter. Det er Jorden i Frugthaverne, der i den Henseende frembyder den store Fare. Avlen af nye Cellegenerationer i den frie Natur foregaaer, som vi have hørt, paa den Tid, da Havens søde, saftige Frugter ere modne, i Danmark altsaa navnlig i August og September. Støvet vil i disse Maaneder derfor ikke blot være rigest paa disse Celler, men ogsaa indeholde forholdsvis færre svækkede Individer end til de andre Tider af Aaret. De Støvskyer, som i disse Maaneder hvirvles op fra Jorden i Frugthaverne, indeholde ofte en rig Høst af unge, kraftige Celler.

Mine foran omtalte Analyser af Luftens Mikroorganismer viste, at Saccharomyceterne i 1879 efterhaanden bleve mere og mere almindelige i Luftens Støv i Tidsrummet fra Juni til August, saaledes at den ved dem bevirkede Infektion naaede sit Maximum i Slutningen af den sidstnævnte Maaned. Derefter fandt atter en Aftagen Sted. I 1878 og 1880 var denne Infektion rigeligst i August og September, saaledes at Maximum faldt i Begyndelsen af den sidstnævnte Maaned. Til de andre Tider af Aaret vare de meget sjældne. August og September ere, hvad Infektionen med vilde Gjærceller angaar, de to farligste Maaneder for Bryggerierne.

De aabne Svalebakker ere den Vej, ad hvilken de som Regel komme ind i Driften, undertiden kunne de dog ogsaa trænge direkte ind i Gjæringskjælderen. Sjældnere ville de kunne faa Adgang til Øllet i Lagerfadene, men selv om det sker, vil det, som vi ovenfor have hørt, under normale Forhold ingen Betydning faa; dette gjælder i hvert Fald om de af mig undersøgte Arter.

Saalænge Urten paa Svalebakkerne har sin højeste Temperatur, ville Gjærcellerne enten blive dræbte eller i hvert Fald hindrede i at udvikle sig. Først naar Varmegraden synker, kunne de be-

gynde paa deres Knopskydning. Idet den luftede og nedsvalede Urt føres fra Bakkerne ned i Gjæringskarrene, ville levende Gjærceller kunne sætte sig fast i Ledningerne og formere sig i det tynde Vædskelag, som bliver tilbage. Der kan paa den Maade danne sig hele Arnesteder for Smitten. Den næste Portion Urt vil da blive stærkere inficeret end den foregaaende. Man ser heraf, hvor vigtigt det er hyppigt og grundigt at rense Ledningerne og disses Sammenføjninger; at det samme ogsaa gjælder om Bakkerne og om Siposerne følger af sig selv. Om de Farer, som disse sidste kunne føre med sig, har Will givet værdifulde Oplysninger i »Zeitschrift für das ges. Brauwesen«, 1892. Af særlig Vigtighed er det, at Paasætningsgjæren bliver sat saa hurtigt som muligt til Urten i Gjæringskarrene, for at den strax kan begynde sin Kamp med de ubudne, farlige Gjæster.

Det er dog ikke blot Støvet fra Frugthaverne, der kan føre Sygdomsgjærarterne ind i Bryggerierne; en anden Kilde til Smitte er Bærmen i Lagerfadene. Denne vil, endog i de Bryggerier, hvis Drift er i god Orden, næsten altid indeholde større eller mindre Portioner af vild Gjær; har Bryggeriet været hjemsøgt af Sygdomsgjærarter, saa er en saadan Bærme særlig farlig. Tidligere var det almindeligt i Bryggerierne, at man tog den Sag med stor Ligegyldighed. Bærmen blev spildt i Gaarden; en Del blev derpaa med Folkenes Fodtøj bragt lige ned i Gjæringskjælderen; en stor Del blev tørret ind til Støv og i den Tilstand af Vinden ført ind paa Svalebakkerne og ind i Gjæringskjælderen. Jeg har for nogle Aar siden paa en indtrængende Maade gjort Bryggerne opmærksomme paa denne Fare. Der vises vel ogsaa nu større Forsigtighed end forhen paa dette Punkt, men det er dog ikke overflødigt paany at minde derom.

Den Maade, paa hvilken et Bryggeri vistnok hyppigst faar Sygdomsgjær ført ind, er dog ved at tage Paasætningsgjær fra et andet Bryggeri; der er altid en større eller mindre Fare forbunden dermed. Derfor have de betydeligere Bryggerier nu ogsaa optaget Rendyrkningssystemet i deres Drift.

---

### Blandinger af Bryggerigjærarter.

De to Undergjærarter, som jeg i Aarene 1883 og 1884 indførte i Driften paa Gl. Carlsberg, give begge et godt og fint Produkt, men ere dog, som jeg i mine »Iagttagelser over Bryggerigjærarter« fremhævede, indbyrdes meget forskjellige. Se vi Sagen fra et rent praktisk Standpunkt, saa finde vi navnlig, at Øllet af

Carlsberg Undergjær Nr. 2 er fyldigere og mere kulsyrerigt end Øllet af Carlsberg Undergjær Nr. 1; dette sidste er derimod meget mere holdbart. Under disse Omstændigheder blev Tanken naturligt ledet hen paa at anstille Forsøg med Blandinger af de to Arter.

Bryggeriets Direktør, Hr. Kapt. Kühle, gav godhedsfuldt sit Samtykke til, at disse Forsøg bleve udførte i Driften selv, altsaa med de sædvanlige store Maal. I nogle Tilfælde blandede vi Øllet af de to Gjærarter ved Hovedgjæringens Slutning, saa at Lagerfadene kom til at indeholde begge Ølsorter; i andre Tilfælde anvendte vi en Paasætningsgjær, som bestod af begge Arterne. Da det allerede den Gang havde vist sig, at Carlsberg Undergjær Nr. 1 var den af de to Arter, der, uagtet dens Mangler, dog passede bedst for Driften paa Gl. Carlsberg, bleve alle Forsøgene anstillede saaledes, at denne Gjærart var i Overvægt i den nævnte Paasætningsgjær, og at dens Øl ligeledes udgjorde den overvejende Del af Blandingen af de to Ølsorter.

Enkelthederne i disse Forsøg har jeg forsomt at optegne; Hovedresultatet blev, at Maalet ikke blev naaet, og at dette Blandingsøl, som vi kunne kalde det, i alle Tilfælde var mindre holdbart end det Øl, som udelukkende var gjæret med Carlsberg Undergjær Nr. 1. Ved Holdbarhed forstaaes her, ligesom i de foregaaende Kapitler, det færdigt lagrede Øls Forhold til Dannelsen af Gjærbundfald, og der tænkes slet ikke paa Bakteriesygdomme. Forsøgene bleve jo ogsaa bestandigt udførte med Renkulturer af bekjendte Gjærarter. Holdbart Lagerøl kalder jeg det, som aftappet paa velproppede Flasker kan staa 2—3 Uger ved almindelig Stuevarme uden at danne et betydeligt Gjærbundfald og uden at blive uklart, naar det efter en saadan Henstand bliver godt omrystet.

Da de omtalte Forsøg med Blandingerne altsaa ikke førte til noget, bleve de opgivne, og Bryggeriet baserede den allerstørste Del af sin Drift paa Nr. 1 Gjæren; for nogle Aar siden blev Nr. 2 Gjæren fuldstændigt skudt ud; hele Gjæringen paa Gl. Carlsberg udføres nu af den førstnævnte Art.

For mig var Spørgsmaalet om Gjærblandinger dog hermed ingenlunde afsluttet. Mine talrige Experimenter med Sygdomsgjærarter maatte uvilkaarligt føre mig ind paa nye Undersøgelser i den Retning, omend fra andre Synspunkter end tidligere. Ved denne Lejlighed skal jeg meddele de Undersøgelser, i hvilke det Spørgsmaal blev stillet, hvorledes Blandinger af Bryggerigjærarter forholde sig med Hensyn til Øllets Holdbarhed.

I. Forsøgsrække. — 4 tohalsede Literkolber, A, B, C, D, i hver af hvilke der fandtes 660 Kub.-Centim. af den samme steriliserede og luftede Urt til almindeligt Lagerøl, bleve inficerede med unge, kraftige Vegetationer af de nedenstaaende Gjærarter. Til A blev der sat 1 Kub.-Centim. af Carlsberg Undergjær Nr. 1; til B 1 Kub.-Centim. af den foran omtalte Undergjær fra Tuborg Bryggeri; til C 1 Kub.-Centim. af sidstnævnte Undergjær og $^1/_4$ Kub.-Centim. af Carlsberg Undergjær Nr. 1; til D 1 Kub.-Centim. af Carlsberg Undergjær Nr. 1 og $^1/_4$ Kub.-Centim. af Tuborg Undergjær. Gjæren var i alle Tilfælde temmelig tykflydende. Hovedgjæringen fandt Sted ved almindelig Stuevarme. Efter dens Afslutning havde begge Bryggerigjærarterne i A og B givet god Klaring, hvorimod Klaringen i de Kolber, C og D, i hvilke Gjærblandingen fandtes, var mindre god. Øllet blev derpaa overført paa andre Kolber og henstillet til Lagring ved 7° C.

Da det havde tilbragt omtrent $1^1/_2$ Maaned ved denne Varmegrad, vare A og B fuldstændigt blanke, C og D derimod opaliserende. Øllet blev aftappet paa smaa Flasker paa lignende Maade, som det ovenfor blev beskrevet.

Da det saaledes aftappede Øl havde staaet 12 Døgn ved almindelig Stuevarme, vare A og B fremdeles blanke uden nogen Gjærtykhed; C og D vare derimod endnu lidt opaliserende, og begge viste en begyndende Gjærtykhed, navnlig kunde den tydeligt iagttages i D.

Efter 2 Maaneders Lagring vare C og D mindre opaliserende, men Forholdet forøvrigt væsentligt det samme som sidst.

Medens de to Bryggerigjærarter i Renkulturer hver for sig gave god Klaring, saavel under Hovedgjæringen som Eftergjæringen, og holdbart Øl, var dette altsaa ikke Tilfældet med Blandingerne af dem.

En endnu stærkere Virkning i samme Retning fremkom, naar Gjæringen blev udført af en Blanding af Carlsberg Undergjær Nr. 1 og den Overgjærart, som jeg har kaldt Sacch. cerevisiæ I.

Efterat Forsøgene i Laboratoriet saaledes havde givet den mærkværdige Oplysning, at en god Bryggerigjærart under visse Omstændigheder kan optræde som Sygdomsgjærart, blev det min Opgave at undersøge, om dette ogsaa fandt Sted under Bryggeriforhold. I den Anledning udførte jeg nedenstaaende to Forsøgsrækker; Fremgangsmaaden var den samme som ved de foran beskrevne. Forsøgsanordningen har overhovedet i det væsentlige været den samme i alle Afsnit af den foreliggende Afhandling;

den udførligste Beskrivelse deraf findes i det Afsnit, som handler om Sacch. ellipsoideus II og Sacch. Pastorianus III.

II. Forsøgsrække. — I Gjæringskjælderen paa Gl. Carlsberg bleve to af de ofte omtalte Trækar, B og D, opstillede, hvorpaa der blev bragt 1 Td. (1⅓ Hektoliter) Urt til Lagerøl i hvert. Urten holdt 14,4 % Ball., dens Varmegrad, da Gjæren blev sat til, var 7,5° C.

Til B blev der sat 400 Gr. Carlsberg Undergjær Nr. 2.
- D - - - 360 Gr. — — — og
40 Gr. Carlsberg Undergjær Nr. 1.

Gjæren var temmelig tykflydende, og den bestod af unge, kraftige Vegetationer, der vare avlede i Urt ved c. 10° C.

Efter 9 Døgn var Extraktmængden i B 7,96 og i D 8,04 % Ball. B havde god, D temmelig god Klaring. Øllet fra hvert Kar blev da fadet paa to Foustager, som derefter bleve lagte ned i Lagerkjælderen, hvis Temperatur var c. 2° C.

Efter 1¼ Maaneds Lagring blev der paa den i det Foregaaende omtalte Maade tappet et større Antal Flasker Øl fra det ene Sæt af Foustagerne; disse Flasker bleve derpaa stillede ind i et mørkt Skab ved almindelig Stuevarme. I B fandtes 7,23, i D 6,60 % Ball. Øllet var i begge Tilfælde fuldstændigt klart. Da det havde staaet 11 Døgn, fandtes der endnu intet Bundfald deri. Efter 15 Døgn var B fremdeles fri for Gjærtykhed, medens der derimod i D viste sig en begyndende Gjærtykhed.

Efter 3 Maaneders Lagring blev der paa samme Maade som ovenfor er omtalt taget Prøver af det andet Sæt Foustager. I B fandtes 6,49, i D 6,41 % Ball. Øllet var fuldstændigt klart. Efter 10 Døgns Henstand fandtes der endnu intet Bundfald deri. 5 Døgn senere iagttoges et meget ringe Bundfald i B, men ved Rystning frembragte det ingen Gjærtykhed i Vædsken; i D var dette Bundfald lidt mere udviklet, og ved Rystning blev Vædsken sløret. Den Forskjel i Holdbarhed, som der fandtes efter 1¼ Maaneds Lagring, var altsaa efter 3 Maaneders Lagring omtrent helt forsvunden.

III. Forsøgsrække. — Urten indeholdt i denne Række 14 % Ball., og Gjæringen fandt Sted i 4 Kar.

Til C blev der sat 400 Gr. Carlsberg Undergjær Nr. 1.
- D - - - 380 Gr. — — — og
20 Gr. Carlsberg Undergjær Nr. 2.
- E - - - 400 Gr. — — —
- F - - - 380 Gr. — — — og
20 Gr. Carlsberg Undergjær Nr. 1.

Medens i II. Forsøgsrække Forholdet mellem de to Arter i Blandingen var som 9 : 1, var den i denne Række som 19 : 1. Iøvrigt stemmede de to Rækker overens.

Hovedgjæringen var afsluttet efter 11 Døgn. Extraktmængden var da i C 7,31; i D 7,64; i E 7,39; i F 7,64 % Ball. C og D gave temmelig daarlig Klaring, E og F god Klaring. D stod maaske lidt under C og F lidt under E. I Overensstemmelse med den foregaaende Række var Attenuationen i D lidt svagere end i C og i F lidt svagere end i E. Lagringen foregik paa den i den foregaaende Forsøgsrække omtalte Maade.

Efter $1^{2}/_{3}$ Maaneds Forløb blev der taget et større Antal Prøver i de ofte nævnte Flasker af det ene Sæt af Foustagerne. Øllet var i alle Tilfælde klart. I C fandtes 6,58; i D 6,90; i E 6,25 og i F 6,33 % Ball. Da Flaskerne havde staaet i 14 Døgn, fandtes der i C og E kun et meget ringe Bundfald, som ved Rystning ingen Gjærtykhed fremkaldte; i D og F havde der derimod udviklet sig et stærkere Bundfald, og ved Rystning blev Øllet svagt gjærtykt. Der var altsaa ogsaa i denne Forsøgsrække en kjendelig Forskjel paa Holdbarheden af det Øl, der var gjæret med Renkulturer af de to Bryggerigjærarter hver for sig, og af det Øl, hvis Gjæring var udført af Blandingerne.

Efter omtrent 3 Maaneders Lagring blev Øllet i det andet Sæt Foustager aftappet paa Flasker som foran beskrevet. I C fandtes 6,17; i D 6,33; i E 6,25 og i F 6,33 % Ball. Øllet var i alle Prøverne fuldstændigt klart og holdbart. Den eneste Forskjel, der i den sidstnævnte Henseende nu kunde iagttages, viste sig deri, at Ølprøverne af D, i Modsætning til de øvrige, ved Rystning bleve meget svagt slørede; men om Gjærtykhed var der ejheller her Tale.

En Tilsætning af Bryggeriundergjær til almindeligt Lagerøl paa det Stadium, da det gik i Lagerkjælderen, fik ingen skadelig Indflydelse paa Øllets Holdbarhed; det samme gjælder om Tilsætningen, naar den fandt Sted i de smaa Foustager og Flasker, i hvilke det færdigt lagrede Øl var aftappet. Disse Forsøg bleve anstillede som de tilsvarende, der omtales i de foregaaende Afsnit. I alle Tilfælde har jeg normale, gode Bryggeriforhold for Øje.

**Hovedresultat.** — I de undersøgte Tilfælde viste det sig altsaa, at Paasætningsgjæren gav mindre holdbart Øl, naar den bestod af en Blanding af to Bryggerigjærarter, end naar den kun bestod

af een af Arterne alene, ligemeget hvilken af dem. I disse Blandinger optraadte den Art, der var tilstede i det ringeste Mængdeforhold, som en Sygdomsgjærart. Forsøgene lærte os, at dette ikke blot skete, naar Forholdet mellem de to Arter i Blandingen var som 9 : 1, men ogsaa, naar det var som 19 : 1, altsaa naar kun $^1/_{20}$ af Paasætningsgjæren udgjordes af en fremmed Bryggerigjærart. Vi staa her overfor det ejendommelige Tilfælde, at gode Bryggerigjærarter ligesom skifte Natur, saa at de komme til at virke som Sygdomsgjærarter.

Naar vi erindre, at Carlsberg Undergjær Nr. 2 hører til de Arter, der ikke give særligt holdbart Øl, saa er der egentligt intet Paafaldende deri, at en Tilsætning af denne Art til en Paasætningsgjær, der hovedsageligt bestod af Carlsberg Undergjær Nr. 1, bevirkede, at Øllet blev mindre holdbart, end naar den sidstnævnte Gjærart for sig alene havde udført Gjæringen.

Mærkværdigt er det derimod, at en Tilsætning af Carlsberg Undergjær Nr. 1, der jo netop udmærker sig ved at give holdbart Øl, til en Paasætningsgjær, hvis Hovedmasse var dannet af den anden af de nævnte Gjærarter, dog bevirkede, at det dermed gjærede Øl ligeledes blev mindre holdbart, end om det havde været gjæret med Carlsberg Undergjær Nr. 2 alene.

Det beskrevne Fænomen traadte kun frem, naar Øllets Lagring blev afbrudt paa et temmeligt tidligt Stadium, nemlig efter $1^1/_4$ eller $1^2/_3$ Maaneds Forløb; efter 3 Maaneders Lagring iagttoges i det Højeste kun en svag Antydning deraf. Efter $1^1/_4$ Maaneds Forløb var dog Øllet i alle Tilfælde klart og for Nr. 2 Gjærens Vedkommende af en saadan Beskaffenhed, at det maatte betragtes som færdigt lagret.

I de Bryggerier, i hvilke man arbejder med Gjærarter som den sidstnævnte og derfor kun anvender en kortvarig Lagring, ville Blandinger som de beskrevne kunne fremkalde Forstyrrelser.

Disse Undersøgelser give et nyt Bevis for, at man i Bryggerierne bør arbejde med en Renkultur af en enkelt udvalgt Art eller Race.

---

**Mycoderma cerevisiæ.**

Med ovenstaaende Navn betegnes som bekjendt Gjærceller, der med stor Lethed danne Hinde paa Øl og andre alkoholholdige Vædsker, men som mangle Endosporer, altsaa ikke høre til Saccharomyceterne. Det er gaaet med dette Navn som med flere andre; efterhaanden som Forskningen er trængt videre frem, har man set, at det systematiske Navn ikke omfattede een, men derimod flere

Arter. Nogle af disse frembringe Alkoholgjæring, omend langtfra med den Kraft som de fleste Saccharomyceter. Iblandt Mycoderma-Arterne findes der endvidere nogle, som ifølge de nyeste Undersøgelser fremkalde Sygdomme i undergjæret Øl. Fra flere Sider er jeg bleven opfordret til at udtale mig om disse Spørgsmaal; jeg har tænkt mig, at dette bedst kunde ske i Sammenhæng med de ovenfor staaende Undersøgelser.

Naar man foretager Studier i de kjøbenhavnske Bryggeriers Lagerkjældere, vil man finde Mycod. cerevisiæ allevegne. Jeg fremhævede dette i 1878 i mine Undersøgelser over Øllets Mikroorganismer. I de nærmest følgende Aar foretog jeg meget omfattende Studier af Øllet i Lagerfadene paa Gl. Carlsberg, saavel af det almindelige Lagerøl som af Exportøllet. Ethvert Fad var angrebet af de nævnte Gjærceller, men dog bemærkede jeg ingensinde noget Tegn til, at Øllet af den Grund fik nogensomhelst Sygdom. De vare ogsaa hyppige i de Perioder, da Øllet netop i særlig Grad udmærkede sig ved Holdbarhed og Velsmag.

I de senere Aar har Forstanderen for Bryggerilaboratoriet paa Gl. Carlsberg, Hr. Anton Petersen foretaget lignende Undersøgelser og er herved kommen til det samme Resultat; dette gjælder ligeledes om Prof. Grønlunds Undersøgelser paa Ny Carlsberg. Endvidere har Hr. Direktør Alfred Jørgensen meddelt mig, at der aarlig indsendes flere Hundrede Prøver af sygt Øl til Undersøgelse i hans Laboratorium, men i intet Tilfælde har hverken han eller hans Medarbejdere iagttaget, at Mycod. cerevisiæ var Aarsag til nogen Sygdom. Det samme Resultat erholdt han og hans Medarbejdere ved deres Undersøgelser over Forstyrrelser i selve Driften i forskjellige Bryggerier.

Gl. og Ny Carlsbergs Ølsorter høre til de stærkere; Lagerøllet brygges nu paa c. 14 %, Exportøllet paa c. 16 % Ball. De fleste af de Ølsorter, der bleve undersøgte i Direktør Jørgensens Laboratorium, høre hovedsagelig til den samme Kategori. Man kunde nu tænke sig, at Grunden til, at de nævnte Gjærceller ikke fremkaldte Sygdomme i det af dem angrebne Øl, kan ligge deri, at det fremstilles af en meget extraktrig Urt. Paa den anden Side er det jo ogsaa tænkeligt, at Grunden kan søges paa et helt andet Punkt, nemlig deri, at de Arter eller Racer, der f. Ex. findes i de to sidstnævnte store Bryggerier, overhovedet ikke kunne omdanne Øllet paa en saadan Maade, at det tager kjendelig Skade og bliver sygt. Begge disse Opfattelser have, som vi nedenfor skulle høre, fundet deres Talsmænd.

Naar vi betegne de Vegetationer af Mycod. cerevisiæ, der normalt optræde i det kjøbenhavnske Øl, som væsentligt af uskadelig Natur, saa gjælder dette naturligvis kun under den Forudsætning, at Øllet ikke udsættes for en upassende Behandling. Lader man det f. Ex. henligge i lang Tid i Varmen, i slet spundsede Foustager eller i slet proppede Flasker, saa vil dets Overflade hurtigt blive dækket med Hinder af Mycod. cerevisiæ, og denne Vegetation vil under disse Omstændigheder være nok til at ødelægge det.

---

Den Første, der fremhævede, at Mycod. cerevisiæ under visse Omstændigheder kan foraarsage stor Skade i Bryggerierne, var Belohoubek. Fire Aar derefter, nemlig i 1889, udgav Kukla i »Berichte der Versuchs-Anstalt für Brauindustrie in Bøhmen« nogle Meddelelser om Uklarhed i Øl. Denne Sygdom viste sig paa to Maader. Naar Øllet havde tilbragt 3—4 Uger i Lagerfadene, begyndte det at blive uklart, ligesom opfyldt med et fint Støv, og denne Uklarhed tog til fra Dag til Dag. I det andet Tilfælde var Øllet klart, naar det forlod Lagerkjælderen, og først efter Aftapningen, naar det havde tilbragt en Tid i Forbrugernes Kjældere, blev det uklart. Begge Former af Sygdommen tilskreves den Omstændighed, at Mycod. cerevisiæ har været tilstede under Hovedgjæringen og her har formeret sig. Kukla udtaler endvidere den Opfattelse, at den svage 10 % Urt, som almindeligt anvendes i de bøhmiske Bryggerier, er en særlig gunstig Næringsbund for den nævnte Svamp. Han mener ogsaa, at Maltet paa den Tid, da han foretog sine Undersøgelser, havde en abnorm Sammensætning i Henseende til Forholdet mellem de enkelte Æggehvidestoffer, og at der i Urten var et Misforhold tilstede mellem Sukker og Ikke-Sukker. Meddelelsen er mere skreven for Bryggerne end for Zymoteknikerne; en videnskabelig Begrundelse af de fremsatte Anskuelser findes ikke deri. Kukla lover at ville give en saadan i en særlig Afhandling. Saalænge denne ikke foreligger, vil det ikke være muligt at fælde nogen Dom om disse ejendommelige Spørgsmaal.

I den Afhandling, i hvilken jeg har behandlet Alkoholgjærsvampenes Forhold til Sukkerarterne, udtaler jeg den Formodning, at der under Navnet Mycoderma cerevisiæ skjules ikke een, men flere Arter.

Det er imidlertid først gjennem Laschés Undersøgelser, at vi have erholdt bestemte Oplysninger i den Retning. I »Mittheilungen aus Wahl & Henius Versuchsstation für Brauerei in Chicago, 1891«

beskriver han, hvorledes han af uklart Øl har udskilt 4 forskjellige Arter eller Racer, som alle kunne henføres under det gamle systematiske Navn, Mycod. cerevisiæ. Han anstillede Forsøg med dem i Kolber med steriliseret Urt ved 10° C. og meddeler, at de formerede sig stærkt i Urt, i hvilken de i Forening med en Bryggerigjærart gjennemgik en Hovedgjæring. Hvad der senere skete med det saaledes inficerede Øl under Lagringen og efter Lagringens Slutning, siges der desværre Intet om.

Et andet Forsøg anstillede Lasché paa den Maade, at han fyldte klart, fejlfrit Øl, som netop havde tilendebragt sin Hovedgjæring, paa Flasker. I nogle Tilfælde blev det dog først filtreret gjennem Papir. Disse Flasker bleve derpaa inficerede hver for sig med en af de foran omtalte fire Mycoderma-Arter. Den ene Række af Flaskerne blev godt proppet, den anden derimod kun lukket med Vatpropper. Det viste sig da, at Mycoderma-Cellerne udviklede sig kraftigt i de fleste af de sidstnævnte Flasker, hvad enten de stode ved 10 eller ved 4—6° C., og at Øllet allerede efter 5 Døgn blev uklart. I Flaskerne, som vare godt lukkede med Propper, kom under de nævnte Omstændigheder kun de to af Arterne til Udvikling. Forsøget blev hermed afbrudt, og vi erfare saaledes ejheller i dette Tilfælde, hvorledes Øllet blev, naar det havde tilendebragt en normal Lagring.

Vi faa i Virkeligheden ikke at vide, om det inficerede Øl blev sygt eller ej under Bryggeriforhold, som jo dog er det Synspunkt, hvorfra det hele maa ses. Disse saavel som de foregaaende Undersøgelser fortjene at blive gjenoptagne saaledes, at Forsøgene anstilles i Gjæringskjælder og Lagerkjælder eller i hvert Fald under saadanne Forhold, som stemme nøje overens dermed. Saadanne Bryggeriforsøg ere vel forbundne med særegne Vanskeligheder, men de lønne sig, thi det er kun ad den Vej muligt at opnaa virkelig Klarhed over disse praktiske Spørgsmaal.

Tilsidst meddeler Lasché, at han ved at inficere Øl, der var gjæret med rendyrket Gjær, med sine Mycoderma-Arter og ved derpaa at henstille dette Øl ved almindelig Stuevarme, erholdt det Resultat, at tre af Arterne i Løbet af 4—7 Dage bevirkede, at Øllet blev tykt, og i Løbet af 2 Uger endvidere, at det fik en ubehagelig Smag og Lugt. Den fjerde Art gjorde derimod under de nævnte Omstændigheder Øllet ingensomhelst Skade.

Hvis der her, som jeg maa antage, er Tale om færdigt lagret, undergjæret Øl, som er aftappet paa vel proppede Flasker, saa maa vi unægtelig betragte disse tre Mycoderma-Arter, som meget farlige paa dette Stadium af Gjæringen.

Den af mig undersøgte Form af Mycoderma cerevisiæ, som for nogle Aar siden idetmindste dannede og vistnok endnu danner Hovedmassen af Mycoderma-Vegetationerne i Øllet paa Gl. og Ny Carlsberg, er ikke blot forskjellig fra de af Lasché opstillede Arter eller Racer derved, at den, som ovenfor fremhævet, ikke fremkalder Sygdom i Øllet, men tillige derved, at den ikke heller giver Alkoholgjæring i Ølurt. En af Laschés Arter dannede 0,36, to andre hver 0,79 og den fjerde endog 2,51 Vol. % Alkohol i Ølurt. De af Lasché og mig undersøgte Vegetationer ere saaledes tydeligt forskjellige.

**Hovedresultatet** bliver, at der iblandt de hindedannende Arter, som vi i Almindelighed betegne med det gamle, systematiske Navn Mycoderma cerevisiæ, idetmindste findes een Art, som maa henregnes til de for Ølfabrikationen uskadelige. Denne Art optræder i store Masser i de kjøbenhavnske Bryggeriers Lagerkjældere, og det er den, hvorom mine Undersøgelser dreje sig.

De Mycoderma-Sygdomme, hvorom der i den nyeste Tid berettes fra Forsøgsstationerne i Prag og Chicago, fremkaldes af helt andre Arter. Dette gjælder i hvert Fald om de af Lasché undersøgte.

*Juli 1892.*

# VII.

# Om den nuværende Udbredelse af mit Gjærrendyrknings-System.

---

## 1. Formaalet med denne Oversigt.

I mine foregaaende Afhandlinger i dette og i 2det Bind af Carlsberg Laboratoriets Tidsskrift har jeg givet en udførlig Fremstilling af de Methoder, som jeg har udarbejdet til Gjærens Rendyrkning, Analyse og Behandling, saavel i Bryggeriet som i Laboratoriet. Jeg forudsætter her, at disse Arbejder ere bekjendte.

Enhver Undersøgelse, der paa en gjennemgribende Maade søger at forandre en gammel, rodfæstet Opfattelse, vil møde Modstand, og dobbelt hæftig bliver denne, naar det Spørgsmaal, hvorom det drejer sig, ikke blot har theoretisk, men tillige en praktisk Interesse. Der er imidlertid Intet, der bedre formaar at hjælpe en saadan Sag frem, end gunstige praktiske Resultater. Den Forsker, der ønsker at fremkalde Reformer paa det praktiske Livs Omraade, maa ikke holde sig for god til selv at arbejde i Praxis; det er netop der, at Slagene skulle vindes. Theoretiske Beviser og Udviklinger hjælpe kun lidt. At hans Arbejde dog maa hvile paa et videnskabeligt Grundlag følger af sig selv.

I 1888 gav jeg en Oversigt over den Udbredelse, som mit System da havde opnaaet; jeg fremhævede heri særligt de Bryggerier, der i deres Drift havde indført Rendyrknings-Apparatet. Disse Meddelelser gjorde deres Virkning, navnlig paa Grund af de deri indeholdte nøjagtige Adresser. Praktikerne kunde nu selv i de angivne, ansete Fabriker erfare, hvilke Resultater man havde opnaaet, og saaledes kontrollere Rigtigheden af mine Opgivelser. I den nye Oversigt, som jeg i det Efterfølgende fremlægger for Offentligheden, har jeg fulgt den samme Fremgangsmaade, idet jeg

altsaa atter har lagt Hovedvægten paa at give en Fortegnelse over de Fabriker, der anvende Rendyrknings-Apparatet. Paa det Standpunkt, hvortil Udviklingen nu er naaet, vilde det desuden blive altfor vidtløftigt at nævne alle de Anstalter, som have optaget Rendyrkningen i deres Drift; thi de fleste anvende hertil min gamle Fremgangsmaade (Formering af Renkulturerne i smaa Gjæringskar af den sædvanlige Form).

En Fortegnelse, der som denne omfatter Adresser fra næsten alle Verdensdele, vil naturligvis altid blive ufuldstændig, ihvor megen Umage man end gjør sig dermed. Det er ikke af Mangel paa Høflighed, at Navne ere blevne udeladte, som burde have været optagne.

De fleste af de nedenfor nævnte Fabriker anvende det af Bryggeridirektør Kapt. Kühle og mig i Forening konstruerede Apparat for større, med Dampkraft forsynede Fabriker (se Beskrivelsen i nærværende Tidsskrift, II Bd., 5 Hefte, 1888); i nogle findes en eller anden Ændring deraf og atter i andre det af Bergh og Jørgensen eller det af Marx konstruerede Apparat. I de med en Stjærne betegnede findes det lille Apparat af Lindner[1]).

Et stort Antal af de Laboratorier, som beskjæftige sig med at fremstille den rene Gjær til Brug i Praxis, benytte ligeledes hertil Rendyrknings-Apparatet. Da min Fortegnelse efter min Plan imidlertid kun skal omfatte selve Fabrikerne, forbigaas Laboratorierne her.

I Fortegnelsen fra 1888 fandtes kun Adresser fra Undergjærings-Bryggerier; disses Antal er i den nærværende Fortegnelse voxet i høj Grad, et haandgribeligt Bevis for den Fremgang, det nye System har vundet i de forløbne fire Aar. Dette viser sig ogsaa deri, at det nu har banet sig Vej til Overgjærings-Brygge-

---

[1]) Listen blev afsluttet i Juli 1892; den er udarbejdet efter Tidsskrifterne og efter Meddelelser fra nedenstaaende Herrer, som jeg herved paany bringer min bedste Tak:

Prof. Dr. Aubry (München), Fabrikant S. Baumann (Wien), Inspektør Bischoff (Fredericia), Burmeister & Wain's Fabrik (Kjøbenhavn), Godsejer Ebbensgaard (Handbjærg Gjærfabrik, Struer), Dr. Eckhardt (Wien), Laboratorieforstander Holten (Wandsbeck), Fabrikant W. Jensen (Kjøbenhavn), Direktør A. Jørgensen (Kjøbenhavn), Dr. Kokosinski (Lille), Dr. Kukla (Prag), Prof. Dr. van Laer (Gand), Dr. P. Lindner (Berlin), Direktør Olesen (Kjøbenhavn), Fabrikant Pest (Berlin), Dr. Prior (Nürnberg), Fabrikant Schneider (Hamburg). Prof. Dr. Vuylsteke (Louvain), Dr. Wahl & Dr. Henius (Chicago), Dr. Wichmann (Wien) og Direktør Wilson (London).

rierne, Spiritus- og Pressegjærfabrikerne, samt Drue- og Frugtvingjæringen, kort sagt til alle Grene af den store Industri, i hvilken Alkoholgjæring anvendes.

Den foreliggende Oversigt giver de Praktikere, som endnu forholde sig tvivlende eller afvisende overfor mine Reformbestræbelser, en lettere Lejlighed end tidligere til i Praxis selv at erkyndige sig om, hvad de bringe. Da jeg ikke har udtaget noget Patent eller paa nogen Maade draget pekuniær Fordel af mine Arbejder, vil Hensigten med denne Oversigt ikke kunne misforstaas[1]).

---

## 2. Undergjærings-Bryggerierne.

Nedenstaaende Fabriker arbejde hver med et eller flere Rendyrknings-Apparater; Bryggerierne Gl. og Ny Carlsberg anvende f. Ex. hver 3 Gjæringscylindre.

### Europa.

*Danmark.*

Gamle Carlsberg, Kjøbenhavn.
Ny Carlsberg, —
Tuborg, —
Rahbeks Allee, —
Marstrand, —
Albani, Odense.
Ceres, Aarhus.

*Norge.*

Frydenlund, Kristiania.
Ringnes, —
Schou, —
Jonassen, Skien.

---

[1]) I Anledning af de Forespørgsler, som endnu jævnlig tilstilles mig, tillader jeg mig atter at fremhæve, at det af mig bestyrede Laboratorium kun er en videnskabelig Forskningsanstalt, og derfor ikke kan paatage sig at udføre Analyser, fremstille Renkulturer eller overhovedet at udføre noget Arbejde for D'Hrr. Industridrivende.

*Sverrig.*

Bjurholm & Co., Stockholm.
Wiener Bryggeriet, —
Stora Bryggeriet, —
Lyckholm & Co., Gøteborg.
A. Sandwall, Borås.

*Tydskland.*

Victoria Brauerei Act. Ges., Berlin.
Böhmisches Brauhaus, —
Carl Gregory, —
Act. Brauerei Ges. Friederichshöhe (vorm. Patzenhofer), Berlin.
Vereinsbrauerei Rixdorf, Berlin.
Act. Ges. Schlossbrauerei Schoeneberg, Berlin.
Act. Brauerei Ges. Moabit, Berlin.
Berliner Bockbier Brauerei, —
Schultheiss-Brauerei Act. Ges., Berlin.
F. W. Reichenkron, Berliner Bären Brauerei, Charlottenburg b. Berlin.
*Pfefferberg, Berlin.
Versuchsbrauerei, Berlin.
Export-Brauerei Teufelsbrücke (vorm. Ross & Co.), Kleinflottbeck b. Hamburg.
Löwen Brauerei, Act. Ges., Hamburg.
St. Pauli, Act. Brauerei, —
Marienthal, Act. Brauerei, Wandsbeck.
Holsten Brauerei, Altona.
Weber, Harburger Act. Brauerei, Harburg.
Stettiner Bergschloss-Brauerei Com.-Ges. a. A. (vorm. Rudolf Rückforth), Stettin.
Mahn & Ohlerich, Act. Brauerei, Rostock i. M.
*Matschenz, Neu Strelitz.
Lindener Act. Brauerei, Hannover.
Staedt. Lagerbier Brauerei, —
Kaiserbrauerei Ricklingen, R. b. Hannover.
Bavaria Act. Brauerei, Posen.
Frankfurter Bierbrauerei Ges., Frankfurt a. M.
C. Bauer, Halle a. S.
Riebeck & Co., Leipziger Bierbrauerei, Reudnitz, Leipzig.
Act. Brauerei, Erfurt.
*Frohberg, Grimma.
*Nostitz, Zittau.

*Schaar, Poesneck in Th.
*Felsenkellerbrauerei, Meissen.
*Bürgerliches Brauhaus, Dresden-Plauen.
Otto Allendorf, Kaiserbrauerei, Schoenebeck a. d. Elbe.
Westphalia, Harpe in W.
Englisch Brunnen, Act. Brauerei, Elbing.
Bergische Brauerei Ges. (vorm. Gustav Küpper), Elberfeld.
Altenburg Act. Brauerei, S. Altenburg.
Rheinische Brauerei Ges., Alteburg b. Köln.
I. Geyl, Bierbrauerei E. Meyer, Mainz.
*Anklamer Bergschlossbrauerei, Anklam.
*C. Wolters & Co. Herzogl. Hofbrauhaus, Braunschweig.
*Salomon, Braunschweig.
*Baldes, St. Johann.
H. & I. ten Doornkaat-Koolmann, Westgaste b. Norden, Ostfriesland.
*Stams, Wesel.
*Ebert, Scheibe.
*Stadtbrauerei, Eilenburg.
F. Brinkmann, Herbede.
Dortmunder Brauerei Ges., Dortmund.
*Bautz & Co., München-Gladbach.
Erste Bamberger Exp. Bierbrauerei Frankenbräu, Bamberg.
Staatsbrauerei Weihenstephan, Weihenstephan b. München.
Dr. Hugo Eckenroth, Ludwigshafen a. R.
Gebr. Grüner, Fürth.
Conrad Fuglsang, Mühlheim a. d. Ruhr.
Act. Bierbrauerei, Essen a. d. Ruhr.
Rob. Leicht, Vaihingen a. d. Fildern, Württemberg.
C. Wiedmayer, Möhringen a. d. Fildern, —
Brauerei der Versuchsstation, Hohenheim, —
I. H. Bernecker, Böhmisches Brauhaus, Insterburg.
Adelshoffen (vorm. Ehrhardt frères), Schiltigheim, Strassburg.
Th. Boch & Co. Lutterbach, Elsass.
E. Lychenheim, Schwartau.

*Østerrig.*

A. Dreher's Brauhaus, Klein-Schwechat b. Wien.
Brunner Brauerei, Brunn am Gebirg b. —
Krotoschin, Mähren.

*Frankrig.*

La Meuse, Bar-le-duc.
M. Schmidt, Belfort.

*Holland.*

De Deli Brouwerij, Nieuwer Amstel b. Amsterdam.
Heinecken, Rotterdam.
*Arminius Bau, Haag.
*Smits von Waesberghe, Breda.

*Schweiz.*

Uetliberg, Wiedikon b. Zürich.

*Finland.*

Söderström, Sörnäs, Helsingfors.

*Rusland.*

Kalinkin, St. Petersborg.
Neu Bavaria, —
I. Durdin, —
Trochgorny, Moskau.
Karneef & Gorschanoff, Moskau.
Kuntzendorff, Riga.
Ilgezeemsche Bierbrauerei, Riga.
von Strizky, —
Fr. Jenny & Co., Odessa.
Kempe & Durian, —
Sanzenbacher & Co., Odessa.

*Polen.*

Haberbusch & Schiele, Warschau.

*Spanien.*

La cruz blanca, Santander.

## Amerika.

*Nord-Amerika.*

S. Liebman's Sons Brewing Co., Brooklyn, New York.
M. Gottfried, Brewing Co., Chicago, Illinois.
F. J. Dewes, Brewing Co., — —
Peter Schönhofen, Brewing Co. — —
Pabst, Brewing Co., Milwaukee.
Jos. Schlitz, Brewing Co., —
Anheuser Busch, Brewing Association, St. Louis, Missouri.
Reymann, Brewing Co., Wheeling, West Virginia.

San Francisco Breweries Limited, San Francisco, Californien.
Compania Cervecera, Toluca, Mexiko.

*Syd-Amerika.*

Ernst Stier, Calo Santa Fé, Buenos Ayres.
Brasserie Argentine, Quilmer, —
H. Winkler, Montevideo.
Nieding, —
Theodor Schmidt, Tucumane, Argentina.
*Hoffmann & Ribbeck, Valparaiso, Chile.
Don Carlos Schormann, — —
Cornelius & Co., — —
Anwandter H^os^, Valdivia, Chile.
Keller Hermanos, Concepcion, Chile.
Ernst Schultze & Co., La Paz.
G. Fuchs, San Francisco de Limache.
Fabrica Cerveja Bavaria, St. Paulo, Brasilien.

## Asien.

The Osaka Brewing Co., Japan.
The Manila Brewery, Manila.

## Australien.

The Foster Brewing Co., Melbourne.

---

Det er kun en lille Del af de Bryggerier, der nu have optaget mit System i deres Drift, som anvende de foran nævnte Apparater hertil; de fleste arbejde, som foran berørt, endnu efter min gamle Fremgangsmaade, idet de til den første Formering af Gjæren benytte smaa, almindelige Gjæringskar. Antallet af saadanne Bryggerier beløber sig til flere Hundrede og findes i alle Lande, hvor Undergjæring anvendes. Jørgensens Laboratorium i Kjøbenhavn har meddelt mig, at det for sin Del aarlig forsyner 66 saadanne smaa Fabriker i forskjellige Lande med rendyrket Gjær. I »Bayerisches Brauer Journal« den 18. Juli 1891 meddeler Dr. Prior, Direktøren for den af den bayerske Regjering subventionerede Forsøgsstation i Nürnberg, at denne Station aarlig udsender flere tusinde Liter i smaa Portioner til de smaa Bryggerier i

Bayern. Flere af de andre Stationer, som ligeledes beskjæftige sig med at fremstille rendyrket Gjær til Bryggeribrug, kunne sandsynligvis ogsaa henvise til en lignende Virksomhed.

En ejendommelig Stilling indtager Bøhmen. Som bekjendt har Bryggerivæsenet opnaaet en fremragende Plads i dette Land; dog var det et af de Steder, hvor Gjær-Rendyrkningen sent blev indført, nemlig længe efter at den i andre Lande havde vundet Anerkjendelse. Paa et tidligt Stadium optraadte vel Prof., Dr. Bělohoubek som Talsmand for denne Reform samtidig med, at han indtrængende opfordrede til at oprette en Forsøgsstation for Bryggerivæsen i Prag; men først da denne Plan var bleven virkeliggjort, fik ogsaa den nævnte Reform Fremgang i Bøhmen, nemlig ved Direktør Kuklas energiske Bestræbelser. I den Beretning, som han i »Oesterreich. Brauer- und Hopfenzeit.« 1891 gav om Stationens Virksomhed, meddeler han, at der iblandt de Bryggerier, som faa rendyrket Gjær fra Stationen, findes 20, som udelukkende i deres Drift anvende denne. Nogle af disse Bryggerier ere udenlandske, men om den største Del maa jeg antage, at de findes i Bøhmen. Det mærkelige her er, at alle de bøhmiske Bryggerier, som anvende mit System, ere smaa Fabriker. Rendyrknings-Apparatet er intetsteds indført, og saa vidt jeg har kunnet erfare, have overhovedet ingen af de store Bryggerier indført Rendyrkningen i deres Drift. Forholdene i Bøhmen ere altsaa i den Henseende forskjellige fra, hvad der i alle andre Lande har fundet Sted. Det vilde føre os for langt bort fra vort Hovedæmne, hvis vi vilde forsøge paa at efterspore Aarsagerne til disse ejendommelige Forhold.

Forinden jeg slutter dette Afsnit, vil det have sin Interesse at kaste et Blik paa Nord-Amerika. Det er her, at Rendyrknings-Systemet i de sidste Par Aar har havt den største Fremgang. Ovenstaaende Fortegnelse viser, at de største og mest berømte Bryggerier have optaget det. Dr. Wahl og Dr. Henius meddele i deres Tidsskrift, at Rendyrkningen nu med det bedste Resultat er indført i over 50 nordamerikanske Bryggerier.

Forholdene i denne Verdensdel ere gjennemgaaende større end i Europa. Af de i den ovenstaaende Fortegnelse nævnte Bryggerier producerer saaledes Pabst i Milwaukee aarligt c. 750,000 Barrels (c. 900,000 Hektoliter), Jos. Schlitz i Milwaukee c. 600,000 Barrels (c. 700,000 Hektoliter) og Anheuser Busch i St. Louis c. 542,000 Barrels (c. 630,000 Hektoliter). Til Sammenligning kan her meddeles, at Gamle Carlsbergs aarlige Produktion er 290,000 Hektoliter. Alt i Alt se vi, at det er en kæmpe-

mæssig Industri, hvormed vi her beskjæftige os, og at der i den ikke regnes med Tusinder men med Millioner.

---

## 3. Overgjærings-Bryggerierne.

Nedenstaaende Bryggerier anvende Rendyrknings-Apparater i deres Drift:

### Europa.

*Danmark.*

Rahbeks Allee, Kjøbenhavn.
Wiibroe, Helsingør.
Bie, Hobro.

*Tydskland.*

*Janssen Wittwe, Hamburg.
*Brau Commune, Liegnitz.

*Frankrig.*

Dazin frères, Roubaix.
P. & E. Blanquet, St. Omer.
Masse-Meurisse fils, Lille.
E. Vennin, —
E. Butruille, Douai.

*Holland.*

Baartz & Zoon, Brouwerij d'Oranjeboom, Rotterdam.
C. van Stolk, A. zn., Brouwerij de Posthoorn, —

*Belgien.*

Caulier, 10 rue Herry, Bruxelles.
Spreux, 5 rue des Corriers, Tournai.
Boonaerts & van Breedam, Malines.
Van Tilt soeurs, brasserie la Sirène, Louvain.
Avedyck & Co., ancienne brasserie Beckx, Louvain.

*Finland.*

Söderström, Sörnäs, Helsingfors.

Da jeg i 1884 havde faaet Rendyrkningen gjennemført i nogle af de danske og tydske Undergjærings-Bryggerier, opfordrede jeg Hr. Direktør Alfred Jørgensen til at anstille lignende Forsøg i danske Overgjærings-Bryggerier. Det viste sig da, at Udvalget i dette Tilfælde maatte gjøres mellem de svagt forgjærende og hurtigt klarende Gjærracer. Allerede i 1885 lykkedes det Jørgensen ved Samarbejde med Hr. Bryggeribestyrer, cand. polyt. Joh. Wulff at faa Rendyrkningen indført i Wiibroes Bryggeri i Helsingør. Senere fik det nye System fast Fod i Bryggeriet Rahbeks Allee. Dette skete i 1891, da Konsul W. Haurowitz overtog Direktionen af denne og de øvrige til Selskabet »De Forenede Bryggerier« hørende Fabriker. Ved Hjælp af 2 Gjæringscylindre forsynes herfra ikke blot det nævnte Bryggeri, men tillige de andre Overgjærings-Bryggerier, som høre til dette Selskab. Samtidig hermed havde Jørgensen ligeledes i Baartz's Bryggeri d'Oranjeboom i Rotterdam indført en rendyrket Overgjær. Den tekniske Direktør Hr. Grimmer gav i 1890 en Meddelelse derom, hvoraf fremgik, at man havde erholdt gode Resultater dermed. I »Oesterreich. Brauer- und Hopfen Zeitung« 1892, Nr. 15, meddeler han, at dette berømte Bryggeri nu systematisk har sat Rendyrkningen i Gang i sin Drift ved Hjælp af 3 Apparater. Ogsaa Arminius Bau har med Held indført Rendyrkningen i hollandske Overgjærings-Bryggerier. Jørgensens Laboratorium har i de senere Aar ligeledes forsynet et stort Antal andre udenlandske Overgjærings-Bryggerier med rendyrkede, planmæssigt udvalgte Gjærracer.

Den Erfaring er herved bleven fastslaaet, at ligesom der gives forskjellige Kultur-Undergjærarter og Racer, saaledes gives der ogsaa forskjellige Kultur-Overgjærarter og Racer, hvoraf flere i høj Grad adskille sig fra hverandre i deres Maade at arbejde paa. For at tilfredsstille de mangeartede Fordringer til Øllets Beskaffenhed, som der stilles, bliver det her mindst ligesaa nødvendigt som i Undergjæringen at foretage et planmæssigt Udvalg.

Idet Arterne og Racerne ere saa forskjellige, vil den samme Behandling ikke være passende for alle. De Oplysninger, som jeg i den Retning har givet om Undergjær i 1ste Hefte af mine »Untersuchungen aus der Praxis der Gärungsindustrie«, have ogsaa her deres Gyldighed; en almindelig Regel lader sig ikke opstille.

I Ringnes & Co. Bryggeri i Kristiania indførte Dr. Olsen rendyrket Overgjær.

Tidligt fandt dette Fremskridt sin Vej til Australien. I Tidsskriftet »The Australian Brewer's Journal« (Melbourne, December 20,

1888 og January 20, 1889) meddeler Mac Cartie og De Bavay, at det har givet gode Resultater i flere af de australske Overgjærings-Bryggerier og ikke blot til de lettere Ølsorter (running ales), men ogsaa til de stærkere (stock beers). De fremhæve, at der ikke har vist sig nogen Vanskelighed i at opnaa en passende Eftergjæring, og at de i Melbourne i det Væsentlige fabrikere lignende Ølsorter som i England. Dette har sin særlige Interesse, da man nemlig i det sidstnævnte Land havde været tilbøjelig til at mene, at en rendyrket Gjær, bestaaende af een Art, ikke vilde være i Stand til at give den ønskede Eftergjæring (condition). Forsøgene i Australien bleve dels udførte med en Art, som danner Hovedmassen af en Overgjær, der blev anvendt i et Bryggeri i Burton on Trent i England, dels med Arter, som stammede fra australske Bryggerier. Den første var bleven fremstillet i Alfred Jørgensens, de sidste i De Bavays Laboratorium.

I de nordfranske Overgjærings-Bryggerier er Rendyrkningen nu med Held bleven indført af Dr. Kokosinski, Direktør for Bryggeri-Stationen i Lille. Han meddeler i sin Afhandling »Application industrielle de la méthode Hansen à la fermentation haute« (Station scientifique de brasserie. Comptes rendus. Gand. 1890. p. 13), at han begyndte sine Forsøg i den Retning i 1888 i et Bryggeri i Lille, og at Systemet to Aar derefter var indført i 15 Overgjærings-Bryggerier i Nord-Frankrig.

Som et Bidrag til Oplysning om de Resultater, som ere vundne derved i dette Land, har Hr. Prof. Grønlund (Ny Carlsberg) godhedsfuldt meddelt mig, at D'Hrr. Dazin frères, Brasserie de Beaurepaire i Roubaix, 16. Novbr. 1891 skreve saaledes til ham: »Siden 1888 har jeg i det Bryggeri, hvis Chef jeg er, anvendt rendyrket Overgjær, og efter adskillige mere eller mindre heldige Forsøg har jeg fundet en Race, som passer for vort Etablissement; Øllet har i høj Grad vundet derved.«

I 1889 anstillede Dr. I. Vuylsteke, Prof. ved Universitetet i Louvain, lignende Forsøg i et Par belgiske Bryggerier, hvilke ogsaa fik et særdeles gunstigt Udfald. Omtrent paa samme Tid havde Dr. van Laer, Prof. ved Bryggeri-Stationen i Gand, ligeledes begyndt at arbejde i den Retning. Han stiftede i 1891 »La Societé des Ferments purs« og har herved paa en kraftig Maade skaffet det nye System stor Udbredelse i Belgiens, Hollands og Nord-Frankrigs Overgjærings-Bryggerier. Dette Selskabs Gjærfabrikation foregaar i de to ovenfor nævnte Bryggerier, Caulier i Bruxelles og Spreux i Tournai. Der arbejdes her fortrinsvis med to Racer, en stærkt og en svagt forgjærende. Naar den absolut

rene Gjær forlader Formerings-Apparaterne og gaar ud i de to nævnte Bryggerier, bliver den sat til steriliseret Urt i lukkede Gjæringskar. De Rum, hvori disse ere opstillede, ere forsynede med steril Luft, hvilket ogsaa gjælder om det Rum, hvori Gjæren bliver indpakket til Forsendelse. Saavel herom som om Selskabets Virksomhed overhovedet findes en Række Artikler i »La Gazette du Brasseur«. Ved de belgiske Bryggeres Congres i Gand i Juli 1892 meddelte Hr. Spreux, at Selskabet i Løbet af den sidste Maaned havde leveret rendyrket Gjær til 75 belgiske Bryggerier, og at det havde 60 faste Abonnenter i Belgien, Holland og Frankrig, som regelmæssigt hver Uge eller hver fjortende Dag faa den nødvendige Gjær tilsendt.

I Belgien er Fabrikationen af den rendyrkede Gjær og Handelen dermed altsaa bleven knyttet til to Bryggerier, i de andre Lande er det derimod de gjæringstekniske Laboratorier, som have kastet sig derover. Stationen i Berlin adskiller sig dog fra de andre Laboratorier derved, at den selv har bygget sig et Bryggeri og i dette har indrettet en Afdeling for Fabrikationen af rendyrket Gjær, væsentligt paa samme Maade som »La Societé des Ferments purs« i Belgien.

Vi have saaledes set, at Rendyrknings-Systemet ogsaa i Overgjærings-Bryggerierne har vundet en stor Udbredelse. De mest ansete Authoriteter have ligeledes paa dette Omraade betegnet det som et stort Fremskridt. Paafaldende er det da, at det endnu næsten ikke har opnaaet nogen Indgang i England, det Land, i hvilket Overgjæringen fra gammel Tid af har været fremherskende, og i hvilket de største Bryggerier i Verden findes.

Da jeg i 1889 i London holdt mit Foredrag »On my system of pure yeast culture and its application in top fermentation breweries« (se »Transactions of the Laboratory Club«), havde denne Sag vel ogsaa i England vakt en levende Interesse, men man holdt mere af at diskutere derom end af at anstille Forsøg. Gordon Salamon havde i sine »Cantor Lectures« givet en Oversigt over mine Undersøgelser og anbefalet de engelske Bryggere at gjøre Prøver efter den af mig angivne Fremgangsmaade; men hans Opfordring fandt kun en ringe Tilslutning. Saavidt jeg ved, havde paa den Tid kun H. T. Brown og Morris anstillet saadanne Forsøg, nemlig i Worthington's Bryggeri i Burton on Trent. Disse Forsøg gave vel intet afgjørende Resultat, men dog vare begge de nævnte Kemikere af den Anskuelse, at den nye Reform tilsidst ogsaa vilde bane sig Vej i det engelske Bryggerivæsen, som det var sket andetsteds. De fleste engelske Gjæringsteknikere

havde den Gang vistnok i Almindelighed den Mening, at Gjærrendyrkningen kunde anvendes i Fabrikationen af de lettere Ølsorter (running beers, running ales), men derimod ikke til de sværere (stock beers), som underkastes en Eftergjæring. Om denne Eftergjæring havde man dannet sig den Opfattelse, at den beroede derpaa, at Maltodextrin og visse Dextriner, som ikke kunde angribes under Hovedgjæringen, bleve under Lagringen omdannede til Maltose og derpaa forgjærede. For at denne Eftergjæring skulde kunne indtræde, antog man endvidere, at der maatte være visse vilde Undergjærarter tilstede. Experimentelle Beviser for Rigtigheden af denne Lære blev der ikke givet, men derimod hyppige og udførlige Diskussioner derom i forskjellige Tidsskrifter.

Som det erindres havde afdøde Kapt. J. C. Jacobsen paa Gl. Carlsberg en lignende Opfattelse med Hensyn til det undergjærede Øl, idet han antog, at de vilde Gjærarter, som jeg jo udelukkede, netop vare nødvendige for at fremkalde Eftergjæringen. Han mente at finde Støtte herfor i nogle Udtalelser i Reess's og Pasteurs Værker, hvilke ogsaa kunne forstaas paa denne Maade. At denne Opfattelse var urigtig, godtgjorde jeg ved direkte Forsøg.

I mit foran nævnte Foredrag i London henviste jeg dertil. De i det Foregaaende beskrevne gunstige Resultater fra Bryggerier i Australien, hvor der blev arbejdet væsentligt efter engelske Methoder, talte ligeledes imod de Indvendinger, der bleve opstillede i England. Da der syntes at være en Tilbøjelighed tilstede til at anstille Forsøg med en Blanding af flere Gjærarter, beskrev jeg, hvorledes disse kunne udføres. Ogsaa denne Fremgangsmaade kræver naturligvis Rendyrkning, hvis man vil have Sikkerhed. Da den imidlertid vil volde Bryggerne store Vanskeligheder, fraraadede jeg at anvende den, men tilskyndede derimod til at fortsætte Forsøgene med enkelte, planmæssigt udvalgte Gjærracer efter de af mig udarbejdede Methoder.

Der er for de engelske Overgjærings-Bryggerier de samme Grunde til at optage det nye System, som der er for de øvrige Grene af Gjæringsindustrien. Gjæringerne i de engelske Bryggerier ere ligesom andensteds udsatte for at blive angrebne af Bakterier og vilde Gjærsvampe, der kunne fremkalde Sygdomme i Øllet og derved foraarsage stor Forstyrrelse og store Pengetab. I den engelske Bryggerigjær findes tillige som Regel ikke een men flere Kulturarter; der haves slet ingen Sikkerhed for, at den gunstige Art er i Overvægt, ja ikke en Gang Sikkerhed for, at den er tilstede. Alt er hèr Tilfældighed; Bryg-

geren ved i Virkeligheden slet intet om den Gjær, som han sætter til sine Gjæringskar.

En stor Del af de gamle Bryggerier i England, som jeg havde Lejlighed til at se, havde daarligt indrettede Gjæringsrum, og saaledes som Pladsforholdene vare, var det ikke muligt at foretage en Ændring i den Henseende. De vare, ligesom Svalebakkerne, i høj Grad udsatte for Støv; enhver Luftstrøm førte Infektion med sig. Under saadanne Omstændigheder er der netop en særlig Grund til at lade store Masser af rendyrket Gjær af den gunstige Race gaa igjennem Driften. Herved bekæmpes saavel Bakterier som vilde Gjærarter paa den kraftigste Maade. Kan eller vil man ikke fuldstændigt indføre Rendyrkningen, saa har man det dog ved denne Fremgangsmaade i sin Magt at holde den ønskede Gjærart i Overvægt.

Efter mit Besøg begyndte man i nogle Bryggerier at anstille Forsøg, og nye Talsmænd traadte offentligt op for mit System, deriblandt navnlig Hagen-Schow og Dr. Sykes. I Løbet af det sidste Par Aar have flere Bryggerier i forskjellige Egne af England faaet regelmæssige Sendinger af rendyrkede Overgjærarter fra Jørgensens Laboratorium i Kjøbenhavn. Jeg slutter heraf, at de maa have opnaaet tilfredsstillende Resultater, da de vel ellers næppe vilde vedblive at anvende deres Penge derpaa. Fra Hr. Frank Wilson, Direktør for Bryggeriet i Castle Street, Long Acre i London, har jeg fornylig modtaget den Meddelelse, at det er lykkedes ham og hans Søn at indføre en rendyrket Gjærrace, som har givet et godt Resultat. Endelig kan jeg, forinden jeg slutter, meddele, at der i denne Sommer er blevet oprettet et Selskab med Navnet »The Brititsh Pure Yeast Company« i Burton on Trent. Den tekniske Leder derfor er den samme som for det ovenfor omtalte Selskab i Bryssel, nemlig Prof., Dr. van Laer. Driften bliver en lignende som i de beskrevne belgiske Rendyrknings-Anstalter, og Formaalet er at forsyne Bryggerierne i Storbritannien med rendyrket Gjær. I de engelske Bryggeritidsskrifter findes Beretning om, at den af van Laer isolerede Gjærrace er bleven prøvet i nogle af de betydeligste Overgjærings-Bryggerier, og det fremhæves, at den har givet den ønskede Eftergjæring og Øl af en fortrinlig Beskaffenhed. Saaledes synes det nye Fremskridt nu ogsaa i en nær Fremtid at skulle vinde Fodfæste i det store konservative Ørige, i hvilket den gamle Overgjærings-Methode gjennem Aarhundreder har holdt sig.

## 4. Spiritus- og Pressegjærfabrikerne.

Da man som bekjendt i den samme Fabrik saavel producerer Spiritus som Pressegjær og ligeledes i den samme Fabrik snart lægger Hovedvægten paa det ene, snart paa det andet af disse Produkter, saa har jeg ikke foretaget nogen Adskillelse mellem Brænderier og Pressegjærfabriker. Følgende Fabriker arbejde med Rendyrknings-Apparat:

### Europa.

*Danmark.*

De danske Spritfabriker, Fredericia.

*Tydskland.*

Presshefe Fabrik des Vereins der Spiritus Fabrikanten in Deutschland, Berlin.

*Frankrig.*

Vezia, Kiderlin & Co., Bordeaux.

*Rusland.*

*Haase, Pensa.

### Amerika.

P. Varando & Co., Buenos Ayres.

### Asien.

Ynchausti & Co., Manila.
Parry & Co., Madras.

---

Det er først i de senere Aar, at man i disse Fabrikationer har optaget det nye System. I Handbjærg Gjær- og Spritfabrik i Jylland har man i Følge velvillig Meddelelse fra Ejeren, Hr. Ebbensgaard, i længere Tid med Held benyttet en rendyrket Gjærrace fra Direktør Alfred Jørgensens Laboratorium i Kjøbenhavn. De danske Spritfabriker ere imidlertid de første, som have indført Rendyrknings-Apparatet, og som overhovedet paa en systematisk Maade have anvendt Rendyrkningen. Direktøren, Hr. Olesen, og Hr. Inspektør Bischoff, hvem jeg skylder disse Op-

lysninger, have udtalt for mig, at de betragte Rendyrkningen som et afgjort Fremskridt ogsaa for Gjærfabrikationen. Den Afdeling af Fabrikerne, som findes i Fredericia, har ved Hjælp af Apparatet i lang Tid fremstillet den fornødne Gjær til den daglige Drift, og Paasætningsgjær er herfra ikke blot sendt til Selskabets andre Fabriker, men ogsaa til de fleste øvrige Gjærfabriker herhjemme, samt til en enkelt Fabrik i Udlandet. Det glæder mig, at »De danske Spritfabriker« ere gaaede i Spidsen for denne Reform.

I »Zeitschrift f. Spiritusindustrie«, 1892, Nr. 6, og »Ergänzungsheft« p. 24 henviser Prof., Dr. Delbrück til det gunstige Resultat, der er blevet opnaaet i Bryggerivæsenet, som Udgangspunktet. Han fremhæver derefter, at Dr. P. Lindner i Stationens Laboratorium i Berlin har paavist, at der i de tydske Brænderier arbejdes med en uren Gjær, bestaaende af et stort Antal forskjellige Racer, der adskille sig fra hverandre i Henseende til Formerings- og Gjæringsevne, og hvoraf nogle ere fortrinlige for Driften, andre derimod ubrugelige. Udbyttet indskrænkes imidlertid ikke alene derved, at man anvender uheldige Gjærracer, men tillige derved, at Gjæren er smittet med Bakterier. Som en Følge heraf har Foreningen af de tydske Spiritus-Fabrikanter paa Delbrücks Forslag stillet sig den Opgave at gjennemføre Anvendelsen af rendyrket Gjær, bestaaende af en gunstig Race, i Brænderierne og at indrette en Rendyrknings-Anstalt dertil i Berlin.

Efter nogle forgjæves Forsøg har denne opnaaet gunstige Resultater i de tydske Brænderier. Dr. G. Heinzelmann beretter derom i det nævnte Tidsskrifts Nr. 25: »Det er nu lykkedes Stationens Laboratorium at isolere en Gjærrace, som synes at tilfredsstille de Fordringer, som Praxis stiller til Gjæren. Jeg har udført Forsøg med den i det Store i Hr. Ottos Brænderi i Schlagenthin ved Arnswalde N. M. Førend den rendyrkede Gjær blev indført, bleve Mæskekar og Rørledninger godt rensede med Kalk, men forøvrigt gik Driften paa den gamle Maade. Der blev arbejdet med Majs«.

De Fordele, som den rene Gjær bragte denne Fabrik, bestode deri, at Syredannelsen blev ringere end ellers. Gjæringen blev bedre, hvilket viste sig deri, at man med det samme Materiale erholdt 1 Vol. Procent højere Alkoholudbytte, end naar man anvendte den tidligere urene Gjær. Endelig syntes den Spiritus, som den rendyrkede Gjær gav, at have en behageligere Smag og Lugt end den, man plejede at erholde.

De senere Erfaringer lyde ligesaa gunstige (se samme Tidsskrifts Nr. 28):

Et Damp-Kornbrændevinsbrænderi, i hvilket der blev arbejdet med en Blanding af Majs, Rug, Havre og Grønmalt, havde hidtil opnaaet et godt Udbytte ved Anvendelse af den sædvanlige urene Gjær, men da Forsøget blev anstillet med den rendyrkede Gjærrace, viste det sig desuagtet, at denne gav 0,2—0,25 Procent højere Udbytte pr. Mæskningsrum end tidligere. Naar der blev anvendt en ren Rugmæskning var Resultatet endnu gunstigere.

Et stort Majsbrænderi meddeler, at det ved at anvende den rendyrkede Gjær erholdt et Udbytte af 11,66 Procent, hvorimod det med den sædvanlige urene Gjær kun opnaaede 11,4. Fra et Melassebrænderi og en Pressegjærfabrik foreligger der ligeledes meget gunstige Resultater. I en anden Pressegjærfabrik mislykkedes derimod Forsøget. Dette er det eneste ugunstige Tilfælde, der er bekjendt. Ogsaa i Kartoffelbrænderierne synes den samme rendyrkede Gjær at give et godt Resultat. Det bemærkes, at der i alle de omtalte Tilfælde kun er Tale om een Race; den betegnes paa Stationen som Nr. II, og den vil herefter uafbrudt blive dyrket der for at kunne yde Paasætningsgjær til de Fabriker, der ere Medlemmer af Foreningen. I disse dyrkes Gjæren hele Tiden i de sædvanlige Kar. Stationens Rendyrknings-Anstalt benytter derimod selvfølgelig Rendyrknings-Apparatet.

Den nye Reforms Fremgang i Spiritus- og Pressegjærfabrikationen kan hermed siges at være sikret. Foreløbig vil det dog vistnok kun være de faa indsigtsfulde Praktikere, der ville forstaa at drage Nytte deraf.

Det vilde langt overskride Grændserne for nærværende Arbejde, om jeg vilde forsøge paa at berigtige de Vildfarelser vedrørende Gjærspørgsmaalet, som have sat sig fast i disse Fabrikationer. Kun eet Punkt maa jeg dog, forinden jeg slutter dette Afsnit, drage frem, da det har en særlig Betydning for den Bevægelse, der nu er begyndt. Det er den samme Vildfarelse, imod hvilken jeg ogsaa maatte kæmpe, da jeg begyndte mine Reformbestræbelser i Bryggerivæsenet. Man forlanger mere af Rendyrkningen, end den efter sit Væsen formaar at yde. Har man en sædvanlig, mere eller mindre uren Gjær, som i vedkommende Fabrik giver et godt Resultat, saa vil man ved Hjælp af en Renkultur, som man har fremstillet deraf, i Reglen ikke kunne forøge Udbyttet. Forkaster man nu den rendyrkede Gjær af den Grund, saa begaar man en Fejl. Betydningen af den rendyrkede Gjær ligger i den Sikkerhed, som den giver. Er Gjærracen rigtigt udvalgt, saa giver den det gunstigste Resultat, og den vedbliver dermed, saalænge Dyrkningsforholdene ere nogenlunde de samme. Ved at anvende den

urene, sædvanlige Gjær har man derimod ingen Sikkerhed; efter kort Tids Forløb kan dens Sammensætning være bleven ændret saaledes, at den giver et alt andet end tilfredsstillende Resultat; man arbejder kort sagt, naar uren Gjær anvendes, altid i Blinde og ved i Virkeligheden slet ikke, hvad det er, man sætter til Næringsvædsken i Gjæringskarrene. Saaledes som Forholdene ere for Øjeblikket, er det Gjæringen, der er Kilden til de fleste og farligste Svingninger i Driften. Ved at indføre en rendyrket, planmæssigt udvalgt Gjærrace faar man paa dette Punkt Sikkerhed og en rationel Drift. Heri ligger Fremskridtet. I Fabrikerne findes imidlertid flere andre Kilder til Svingninger og Farer, og for disse kan den rene Gjær ikke bære Skylden. Den rene Gjær kan, som jeg tidligere stærkt har maattet fremhæve, ikke gjøre Alt. Fordringen til Raaprodukternes gode Beskaffenhed og til en fornuftig og nøjagtig Fremgangsmaade bliver den samme som tidligere.

Endelig kan jeg ogsaa paa dette Sted nævne, at Schiøttz-Christensen i Kjøbenhavn har fremstillet en rendyrket Gjær, som anvendes i Rugbrødsbagningen istedetfor Surdejg.

---

## 5. Drue- og Frugtvingjæringen.

Ved sine Undersøgelser over Vingjæringen kom Pasteur til den Anskuelse, at man uden Fare kan overlade Druemosten til den spontane Gjæring, der fremkaldes af de paa Bærrenes Overflade tilstedeværende Gjærsvampe. I sine »Studier over Øllet« p. 4 udtaler han paany dette. Man vedblev i Virkeligheden ogsaa roligt at lade Tilfældet sørge for Gjæringen; der var foreløbig Ingen, som tænkte paa at udfinde en mere rationel Fremgangsmaade. Paa den Tid gik man ligeledes ud fra, at Saccharomyces ellipsoideus, eller, som Pasteur kaldte den, »la levûre ordinaire du vin«, er een bestemt Art. I 1883 viste jeg, at der idetmindste skjules to Arter under dette Navn. Af de Undersøgelser, som jeg fem Aar senere meddelte om Alkoholgjærsvampenes Forhold til Sukkerarterne, fremgik det endvidere, at der i Jorden under Vinrankerne og andensteds findes Gjærceller, der ligne de Celler, som man plejer at betegne med det systematiske Navn Sacch. ellipsoideus, men som adskille sig fra disse derved, at de mangle Sporer. Flere af disse Ikke-Saccharomyceter fremkalde en livlig Gjæring i Dextroseopløsninger, og det er vel derfor ikke usandsynligt,

at de ofte tage Del i Vingjæringen. De ere vistnok ogsaa blevne beskrevne som hørende til Sacch. ellipsoideus. Af alt dette ses, at Vingjærsvampen ikke er een, men flere Arter.

Da mit Rendyrknings-System havde begyndt at vinde Anerkjendelse i Bryggeriverdenen, blev herved ogsaa Opmærksomheden henledet paa Vingjæringen. Hidtil havde man, som sagt, allevegne overladt den kostbare Druemost til den tilfældige Gjæring.

Den Første, som derpaa underkastede dette Spørgsmaal en videnskabelig Behandling, var Franskmanden Louis Marx (Moniteur scientifique. Paris. 1888). Ved Hjælp af de af mig angivne Methoder til Fremstilling af Renkulturer og til Gjærarternes Analyse paaviste han, at der i enhver Vingjær findes flere Arter, som ofte se ens ud under Mikroskopet, men som desuagtet i andre Henseender ere forskjellige, og som ligeledes i Druemosten udføre en forskjellig Virksomhed. Ligesom hos de af mig undersøgte Saccharomyces-Arter, viste det sig ogsaa her, at Sporernes Udviklingsgang give gode Karakterer.

Af særlig praktisk Betydning ere de Forsøg, som Marx anstillede i den samme Druemost med flere af de af ham isolerede Arter. Han udsaaede hver Art for sig, og det viste sig da, at de kunde frembringe Vin med forskjellig Bouquet og forskjellig Smag. Derfor udtalte han den Anskuelse, at man ved at anvende en Renkultur af en bestemt, udvalgt Gjærart vil være i Stand til at opnaa en bedre Vin end ellers, ogsaa naar Mosten er mindre god. Det er væsentligt de samme Resultater, som de, mine Forsøg med Carlsberg Undergjær Nr. 1 og Nr. 2 i Aarene 1883 og 1884 havde bragt paa Bryggerivæsenets Omraade. Han angav en Methode til at avle store Mængder af den rendyrkede Gjær, saa at man paa en let Maade kunde sikre sig en gunstig Gjæring af Vindruemosten.

Omtrent paa samme Tid som Marx offentliggjorde en anden Franskmand, nemlig Rommier, i Pariser Akademiets »Comptes rendus« nogle Meddelelser om Vingjæring. Han arbejdede dog ikke med Renkulturer, og forsaavidt han ikke tog Gjæren, som den havde udviklet sig i vedkommende Vin, anvendte han lignende Methoder som de, Pasteur i 1876 havde foreslaaet til Bryggerigjærens Rensning. Rommier tager Sagen, som om Forskningen i de mellemliggende Aar havde staaet stille, og synes slet ikke at kjende de Fremskridt, der i den Tid ere gjorte udenfor Frankrig.

Hans Udtalelser gaa ud paa, at Vinens Bouquet alene bestemmes af Gjæren, og at Druemost fra Egne, der kun producere simple Vinsorter, vil give en Vin med de samme Hovedkarakterer

som en eller anden typisk fin Vin, naar man blot anvender Gjær fra den fine Vin dertil. Det er de samme Iagttagelser, som Marx ogsaa meddelte, men de stilles her frem, som om de havde ubetinget Gyldighed. Paa Mostens kemiske Sammensætning lægges der ingen Vægt, Gjæren skal nu udrette Alt. Flere Vingjærings-Teknikere fremkom med lignende Paastande som Rommier.

Jeg havde, som foran berørt, i 1883—1884 for første Gang ved exakte Experimenter vist, at der findes forskjellige Saccharomyces-Arter, og at de give et Gjæringsprodukt af forskjellig Beskaffenhed. Idet jeg i mine Bryggeri-Studier paa en indtrængende Maade henviste til, hvor vigtigt det er at føre Gjæringen med een udvalgt Art eller Race, fremhævede jeg dog tillige, at Øllets Karakter og hele Beskaffenhed bestemmes af flere andre Faktorer end af Gjæren; denne udgjør vel en meget vigtig Faktor, men kun een. Man vil f. Ex. ikke faa Øl af Pilsener Typen, naar man i et Bryggeri, der arbejder efter Münchener Methoden, indfører Gjær fra Pilsen. Enhver kyndig Brygger ved dette, og paa Bryggerivæsenets Omraade kunde man derfor næppe tænke sig, at saadanne overdrevne Paastande som de, hvormed Rommier og hans Tilhængere optraadte, kunde fremkomme. Det har dog hellerikke manglet paa Imødegaaelser, og i disse ere da atter nogle af Modstanderne gaaede for vidt til den modsatte Side. Det er en stor Mangel hos de fleste af de Forfattere, der i de senere Aar have skrevet om Vingjæringen, at de kun paa en overfladisk Maade have sat sig ind i de Undersøgelser, der foreligge om Ølgjæringen; thi disse danne dog Grundlaget, og paa dette Omraade ere de største Fremskridt gjorte.

I 1890 ere to andre Franskmænd, Martinaud og Rietsch, traadte frem med Undersøgelser, der slutte sig nøje til de foran omtalte af Marx; Renkulturer fremstillede de paa samme Maade som den sidste Forsker. De have i Marseille oprettet en Anstalt, for derfra at forsyne Praktikerne med rendyrket Vingjær af udvalgte Racer. I 1891 har Jacquemin i Forening med Marx oprettet en lignende Anstalt i Le Locle.

Det første Skridt til at bringe Vingjæringen i Tydskland ind paa et mere rationelt Spor skyldes Prof., Dr. Müller-Thurgau. Han var den Gang Direktør for den plantefysiologiske Forsøgsstation i Geisenheim ved Rhinen. Beretning om hans Arbejder paa dette Omraade findes i det i Mainz udkommende Tidsskrift, »Weinbau und Weinhandel«. I 1889 havde nogle af Vindyrkerne i denne Egn ifølge hans Forslag samlet en Portion af de sunde, ubeskadigede, altsaa ogsaa skimmelfrie, Druer for sig og derefter

ladet Mosten deraf paa sædvanlig Maade gaa i Gjæring. Denne gjærende Most benyttede de derpaa som Paasætningsgjær til den øvrige Most. Dette var allerede et Skridt fremad. I Efteraaret 1890 bleve de første Forsøg anstillede med en rendyrket Gjær, nemlig med en Art, som Müller-Thurgau havde udskilt af »Steinberger« Vin. Den gav en god Gjæring, og Hr. Schlegel, som giver Beretning derom, opfordrer derfor til at anstille flere Prøver i Praxis dermed. Om Vinens Bouquet har Müller-Thurgau i skarp Modsætning til de franske Forskere den Opfattelse, at den slet ikke betinges af den Gjærart eller Race, hvormed man anstiller Gjæringen, men at den udelukkende er et Produkt af Druen selv. I en Skrivelse, som han i December 1891 var saa god at sende mig, udtaler han sig paa følgende Maade: »Ansporet af Deres Skrifter har jeg i Tydskland først anstillet udstrakte Forsøg angaaende Vinens Rengjæring og, som Følge af disse, efter en stor Maalestok i Praxis iværksat Vingjæringer med en til dette Øjemed udvalgt, rendyrket Gjærrace. Skjøndt vi af tekniske Grunde foreløbigt vare forhindrede i at anvende virkelige Rengjæringer, ere Resultaterne dog ganske betydningsfulde«. Det vil sige, man satte Renkulturer til den sædvanlige Druemost.

I 1892 udgav Prof., Dr. Wortmann, Müller-Thurgaus Efterfølger i Geisenheim, en Afhandling om Druemostens Gjæring med rendyrkede Gjærarter; den udkom i det foran nævnte Tidsskrift. Han fremhæver heri stærkt, at den Methode, som endnu bestandig anvendes ved Vindruemostens Gjæring, er af en aldeles raa Natur, idet det overlades til Tilfældet, om en god Gjæring skal indtræde eller ikke. Derpaa henviser han til de forskjellige Farer, for hvilke Vinen saaledes bliver udsat, og anbefaler paa en indtrængende Maade Indførelsen af saadanne rendyrkede Gjærracer, om hvilke man iforvejen ved, at de give et gunstigt Resultat. Kun paa den Maade kan man, ligesom det er sket i Ølbrygningen, sikre sig et godt Produkt. »Vi erholde«, siger han fremdeles, »forskjellige Produkter, naar vi gjære den samme Most med forskjellige Gjærracer, og disse Produkter ere i samme Grad forskjellige, som de anvendte Gjærracer adskille sig fra hverandre i stærkere eller ringere Grad med Hensyn til deres Egenskaber og Livsvaner«. Dog er det hans Opfattelse, at Vinens Karakter ingensinde udelukkende bestemmes af vedkommende Gjærart, men at den derimod væsentligst er afhængig af Mostens Beskaffenhed. Wortmann er altsaa for Vinens Vedkommende kommen til det samme Resultat, som det, mine Undersøgelser paa Bryggerivæsenets Omraade have bragt. Gjærarterne gjøre deres Indflydelse gjæl-

dende med Hensyn til Vinens Smag, Bouquet og hele Beskaffenhed, men man gaar altfor vidt, naar man tror, at man af simpel Druemost kan fremstille en fin Vin ved blot at lade Gjæringen blive udført af den fine Vins Gjær. I Modsætning til de franske Forskere fremhæver han, at den væsentligste Fordel, som man kan opnaa ved at anvende rendyrket Gjær, bestaar i den større Sikkerhed, som derved erholdes. Wortmanns Afhandling er skreven med stor Klarhed og giver den bedste Oversigt over det Standpunkt, hvortil Udviklingen for Øjeblikket er naaet. I Slutningen meddeler han, at der i hans Forsøgsstation er bleven fremstillet en Række Renkulturer af Vingjærracer, og at der vil blive udsendt en Liste over dem med Meddelelse om deres forskjellige Egenskaber, for at Praktikerne derefter kunne foretage deres Udvalg og anstille Forsøg dermed.

Ogsaa italienske Kemikere og Fysiologer have i den nyeste Tid henvendt deres Opmærksomhed paa Rendyrknings-Spørgsmaalet. Undersøgelser i den Retning foreligge navnlig af Forti og Pichi.

Vi skulle derefter se, hvorledes Forholdene stille sig i Frugtvinfabrikationen. I 1890 gav Franskmanden Kayser en Meddelelse om nogle Forsøg, som han havde anstillet med Æblemost. Han anvendte hertil 7 Gjærarter, enten hver for sig eller i Blandinger, og indrettede sine Forsøg saaledes, at de kom de praktiske Forhold saa nær som muligt. Gjærarterne vare udskilte af forskjellige franske Frugtvine (cidres). Det viste sig, at nogle af dem gave et godt Produkt, andre derimod ikke, og at man ved at anvende en Paasætningsgjær, som kun bestod af een eneste Art, kunde faa en god Frugtvin.

Den Første imidlertid, som paa dette Omraade har anstillet Forsøg i Praxis selv, er Dr. Nathan i Rottweil. Meddelelse herom har han offentliggjort i Tidsskriftet »Der Obstbau«, Stuttgart 1891 og 1892. Nathan er ikke blot Theoretiker, men tillige en anset Praktiker med stor Erfaring paa dette Omraade. Forsøgene bleve udførte efter en meget stor Maalestok og faa derved dobbelt Betydning. De bragte det Resultat, at Frugtvinens Godhed og Karakter i højere Grad bestemmes af den Gjærart, der spiller en Hovedrolle under Gjæringen, end af Mosten. »Naar jeg«, siger han i Afhandlingen fra 1892, »undersøgte de 40 Fade, som jeg havde fyldt med den samme Most af Bær, af Æbler eller af Pærer og derefter inficeret hver med sin Gjærart eller Gjærrace, saa var der i flere Tilfælde en saa stor Forskjel paa Gjæringsproduktet, at Ingen kunde tænke sig, at Mosten var den selvsamme. Imedens

f. Ex. enkelte af Gjærracerne gave Æblemosten en usædvanlig vinagtig Smag og Lugt, havde andre i den Henseende en ringe eller slet ingen Virkning. Mange gave Mosten en meget ubehagelig Bismag«. Nathan fandt endvidere, at hans Gjærarter ikke blot adskille sig fra hverandre derved, at de give Frugtvine af forskjellig Beskaffenhed, men at de tillige fremvise gode biologiske Karakterer, naar Analysen foretages efter den Fremgangsmaade, som jeg har angivet. Den Most, som han anvendte til sine Forsøg, lykkedes det ham at gjøre delvis kimfri, idet han nemlig lod den gaa igjennem en Centrifuge af Berghs Konstruktion. Resultatet var saa gunstigt, at Geheime-Kommerzienrath Duttenhofer, der er Ejer af den Anstalt for Tilberedning af Frugtvine, hvis Bestyrer Dr. Nathan er, har opfordret denne til at indføre Gjærrendyrknings-Systemet i hele Driften. For at fremhjælpe Tilberedningen af Frugtvine i Württemberg har Hr. Duttenhofer tillige draget Omsorg for, at Praktikere paa en billig Maade fra hans Anstalt kunne blive forsynede med gode Gjærracer i rendyrket Tilstand. »Gjærrendyrkningen«, siger Nathan, »vil fremkalde en hel Omvæltning i Frugtvinfabrikationen og bevirke, at den vil hæve sig til en blomstrende Industrigren«.

I Danmark er i den nyeste Tid ogsaa en Begyndelse gjort, idet Andersens Frugtvinfabrik i Slagelse med gode Resultater arbejder med en rendyrket Gjærrace fra Alfred Jørgensens Laboratorium.

---

## 6. Tilbageblik og Slutningsbemærkninger.

I Løbet af de ni Aar, der ere henrundne, siden jeg anstillede mine første praktiske Forsøg i Bryggeriet Gamle Carlsberg, har mit Gjærrendyrknings-System, som det Foregaaende viser os, vundet en stor Udbredelse. Det er nu blevet optaget i alle Grene af den store Industri, i hvilken der foretages en Dyrkning af Alkoholgjærsvampe, og det har vundet Tilhængere i alle Lande; flere af mine tidligere Modstandere ere traadte op som kraftige Forsvarere derfor. Hvilken Forskjel paa nu og den Gang, da Begyndelsen blev gjort!

Prof. Aubry i München, som er en af de Gjæringsteknikere, der først traadte i Skranken for mine Reform-Bestræbelser, siger herom i en Meddelelse fra 1891: »Det var i 1884 ingen let Opgave at være Talsmand for en Sag, der ikke blot fik Autoriteterne i den zymotekniske Videnskab til at trække paa Skuldrene,

men imod hvilken Nogle tillige førte en aaben og energisk Krig paa en saadan Maade, at Bryggerne med Mistillid maatte vende sig bort derfra. Ja, man anvendte endog den Krigsførelse at give Rendyrkningen Skyld for Uheld i Driften, som den Sagkyndige vilde erklære enten for uvæsentlige eller som hidrørende fra andre Aarsager. Under disse Omstændigheder var det kun Overbevisningen om, at Bryggerivæsenet paa den nye Bane vilde opnaa et stort Fremskridt, der gav mig Kraft til fremdeles at arbejde derfor, og kun under store Kampe er det lykkedes endeligt at trænge igjennem«.

Medens Aubry viser hen til Kampene, saa dvæler Alfred Jørgensen i den 3die Udgave af sin Bog »Die Mikroorganismen der Gärungsindustrie« derimod ved det Bifald, som mine Arbejder efterhaanden vandt i Literaturen. Det er i Virkeligheden lige til den sidste Tid gaaet i Bølgegang, snart Modgang, snart Medgang, dog bestandigt fremad. I Begyndelsen var Modstanden stor, men fremragende Kollegaer hjalp mig med at overvinde den. Ved en anden Lejlighed har jeg udtalt min oprigtige Tak derfor og gjentager den atter paa dette Sted.

Efter den Fremgang, som Gjærrendyrknings - Systemet for Øjeblikket har opnaaet, vil det næppe kunne betragtes som en for dristig Tanke, naar jeg mener, at man om en Menneskealder vil være kommen saa vidt dermed, at man ikke vil kunne forstaa de Vanskeligheder, som stillede sig i Vejen, da Banen blev brudt. Det Hele vil da nærmest staa som Noget, der følger af sig selv, ligesom det i Aarhundreder har været Tilfældet med Dyrkningen af de højere Planter i Have- og Landbruget. I Virkeligheden er det jo ogsaa det samme Princip, kun Methoderne, Tekniken, ere anderledes. Den unge Videnskab om Mikroorganismerne er en Udvikling af den ældre biologiske Videnskab om de højere Organismer. Mange af de Problemer i Mikrobiologien, som vi først nu have begyndt at tage fat paa, have i Læren om de højere Planter allerede for lang Tid siden faaet en udførlig Behandling.

Iblandt de Fabrikationer, i hvilke Alkoholgjæring anvendes, frembyder Fabrikationen af undergjæret Øl de simpleste Forhold hvad Gjæringen angaar; det er her lettere end andensteds at beherske denne. En naturlig Følge heraf er, at Rendyrkningen af planmæssigt udvalgte Arter og Racer ogsaa først maatte blive indført i denne Fabrikation. Dette gav derpaa atter Anledning til, at der blev indført Apparater til Luftens Rensning og til at nedsvale og lufte den koghede, sterile Urt uden at bringe den i Berøring med uren Luft. Gjærrendyrkningen blev ikke

alene først begyndt i Undergjærings-Bryggerierne, men har ogsaa her opnaaet en større Fuldkommenhed end paa noget andet Omraade. De Erfaringer, der her ere gjorte, kom derved til at danne Grundlaget for de Forsøg, som i den Retning anstilledes i de andre Grene af Gjæringsindustrien.

Fabrikationen af undergjæret Øl er saa nær beslægtet med Fabrikationen af overgjæret Øl, at det Skridt, som det nye System havde at gjøre for at naa fra den ene til den anden af disse Fabrikationer, var hurtigt gjort. De smaa Ændringer, hvorom der her var Tale, navnlig i Henseende til Konstruktionen af Formeringsapparatet, bleve udførte af Jørgensen, Kokosinski, Jensen og van Laer.

Spiritus- og Pressegjærfabrikationen ere ligesom Tilberedningen af Drue- og Frugtvin de Grene af Gjæringsindustrien, der i Følge deres Natur sidst maatte komme ind paa den nye Bane. Arbejdsmaaden her er meget forskjellig fra den, der anvendes i Undergjærings-Bryggerierne; Mæsken og Mosten ere ligeledes som Regel i højere Grad inficerede end Urten i Bryggerierne, ogsaa naar disse anvende de aabne Svalebakker. Alligevel viser Erfaringen ogsaa her, at en kraftig Renkultur af en god Gjærrace i de allerfleste Tilfælde vil faa Magt over de tilstedeværende Konkurrenter og følgelig ligeledes under disse Omstændigheder give en tilstrækkelig ren Gjæring af den ønskede Beskaffenhed. Som foran berørt have Marx i Druevingjæringen og Nathan i Frugtvingjæringen begyndt at anstille Forsøg paa at sterilisere Mosten.

Undersøgelserne over Alkoholgjærsvampene have indvirket paa andre Industrigrene end de foran nævnte, omend kun paa en indirekte Maade. I det Foredrag, som Prof., Dr. Weigmann holdt ved Indvielsen af Forsøgsstationen for Mejerivæsenet i Kiel (»Der Zweck und die Aufgaben der bakteriologischen Abtheilung der milchwirtschaftlichen Versuchsstation in Kiel«. Beilage zur Milch-Zeitung 1889, Nr. 40), henviser han til de praktiske Resultater, som Gjærrendyrknings-Systemet har bragt Bryggerivæsenet, og han betegner det som en Opgave for Mejeridriften at stræbe hen til at naa et lignende Maal paa de Punkter, hvor en Gjæring finder Sted. Det er navnlig Spørgsmaalene om Flødens Syrning, om Fejl ved Smørret og Mælken og endelig om Ostens Modning, hvorom det her drejer sig. Weigmann har givet vigtige Bidrag til disse Spørgsmaals Løsning; fra hans Laboratorium ere en stor Del af de tydske Mejerier allerede blevne forsynede med Renkulturer af en Bakterieart, som med Held anvendes til Flødens Syrning.

I Danmark har Prof. Storch offentliggjort betydningsfulde Undersøgelser i de samme Retninger, og d'Hrr. Laboratorieforstandere Quist og Zoffmann have forsynet flere af de skandinaviske Mejerier med lignende Renkulturer som Weigmann. I Østerrig er det navnlig Prof. Dr. Adametz, som har taget denne Sag i sin Haand. Paa dette Sted bør ogsaa de i theoretisk Henseende vigtige Undersøgelser af den franske Forsker Duclaux fremhæves.

Ogsaa paa Tobaksfabrikationens Omraade begynder man nu at anvende det samme Princip. Naar Tobaksbladene ere indhøstede, blive de lagte ind paa Lageret i tykke Lag for langsomt at tørres. Her indtræder der en Gjæring, som fremkaldes af Bakterier, og som forandrer Tobakkens Smag og Lugt. Dr. Suchsland i Halle har i 1892 vist, at det er muligt at bibringe den simple, tydske Tobak en finere Aroma og en mildere Smag, naar man sørger for, at den nævnte Gjæring bliver udført af visse Bakteriearter, der findes i Havanna Tobakken og i andre fine Sorter.

Der er ingen Tvivl om, at de øvrige Industrigrene, som mere eller mindre bero paa en Bakteriegjæring, ligeledes snart ville komme med. Mærkværdigt er det, at der i den Henseende endnu intet Skridt er gjort for Eddikefabrikationens Vedkommende.

Det staar nu klart for enhver Gjæringstekniker, som har sat sig ind i den moderne Forsknings Resultater, at Maalet overalt, hvor Gjæringsorganismer anvendes, maa blive det samme, nemlig det at komme bort fra den gamle Fremgangsmaade, i hvilken det blinde Tilfælde herskede. Paa hele dette Omraade er nu en ny Tid oprunden.

*August 1892.*

# Sporernes Udviklingsgang hos Sacch. membranaefaciens, Sacch. Ludwigii og Sacch. anomalus.

Af

J. Chr. Nielsen.

---

Ovennævnte tre Saccharomyces-Arter ere alle for første Gang beskrevne af Prof. Dr. Emil Chr. Hansen og af ham indførte i Literaturen under ovenstaaende Navne. (Om Sacch. membranaefaciens se Carlsberg Laboratoriets Meddelelser II Bd., p. 225, 1888; om Sacch. Ludwigii: Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde V Bd., p. 638, 1889 og Carlsberg Laboratoriets Meddelelser III Bd., p. 62, 1891 og om Sacch. anomalus: Carlsberg Laboratoriets Meddelelser III Bd., p. 71, 1891). For at Læserne kunne vide, hvad det er for Arter, hvorom Talen er, skal jeg, forinden jeg gaar over til at meddele mine i Overskriften angivne Forsøg, i al Korthed gjengive Hovedpunkterne af de berørte Undersøgelser, forsaavidt de tjene til at karakterisere Arterne. Med Sacch. anomalus har jeg ikke blot anstillet Undersøgelser over Sporernes Udviklingsgang, men tillige over Invertin-Udsondring og over dens Forhold til Maltose, og endelig foretaget Bestemmelser med Ebullioskopet. Disse Undersøgelser meddeles i Sammenhæng med Udtoget af Hansens ovennævnte Arbejder.

Sacch. membranaefaciens Hansen er en Gjærform, som optræder med ovale og pølseformede Celler, der omtrent have Udseende som Mycoderma cerevisiae. Paa Overfladen af Ølurt eller Dextrose-Gjærvand danner den meget hurtigt en vel udviklet Hinde. Hverken i Ølurt eller i Opløsninger af Saccharose, Dextrose, Maltose eller Lactose fremkalder den Alkoholgjæring, og ej heller formaar den at invertere Saccharosen. I Spredekulturer med Urt-

Gelatine som Næringsbund danner den matte, graa Pletter, der have stor Lighed med dem, som udvikles af Mycoderma cerevisiae. En anden Ejendommelighed er ogsaa den Lethed, hvormed denne Gjærform gjør Gelatinen flydende. Sacch. membranaefaciens er meget villig til at danne Endosporer, ikke blot paa Gibsblokke og Næringsgelatiner, men ogsaa i Hinderne paa Overfladen af Næringsvædsker; deres Form er meget uregelmæssig.

Sacch. Ludwigii Hansen er den eneste af de hidtil kjendte Saccharomyceter, som man alene ved mikroskopisk Undersøgelse kan skjelne fra de andre til denne Slægt henhørende Arter. Karakteristisk for den er de citronformede Celler, der minde om Sacch. apiculatus; dog ere de ikke saa lidt større end denne Arts. Ejendommelig er navnlig de smukt uddannede Tværvægge, der findes ikke alene imellem de gamle Koloniers langstrakte Celler, men ogsaa i de Kolonier af ovale, pølse- og citronformede Celler, hvoraf de unge Vegetationer bestaa. Arten optræder altsaa i Oidiumform, og de nydannede Celler frigjøres ved en Afspaltning. Sacch. Ludwigii fremkalder Gjæring i Dextrose-Gjærvand, derimod ikke i Opløsninger af Maltose, Lactose og Dextrin. I Dextrose-Gjærvand kan den danne indtil 10 Vol %, men i Ølurt kun 1,2 Vol % Alkohol, hvilket ogsaa umiddelbart fremgaar af dens Forhold overfor Maltose. Den formaar at invertere Saccharoseopløsning, men i Modsætning til de fleste andre Saccharomyceter dør den forholdsvis hurtigt i denne Vædske, som oftest efter 2—3 Aars Forløb. Den er villig til at udvikle Endosporer, ikke alene paa Gibsblokke og Gelatiner, men ogsaa i gode Næringsvædsker, som Gjærvand og Saccharoseopløsninger, ja, selv i Ølurt og under Forhold, hvor der ikke er dannet nogen Hinde. Sporerne spire hos denne Art paa en meget ejendommelig Maade. Der dannes nemlig først et Promycelium, hvorfra da Gjærcellerne løsnes, efter at der er udviklet en Tværvæg. Ved Spiringen af unge Sporer finder der som Regel en Sammensmeltning af deres Nydannelser Sted. Under visse Betingelser kan den danne et Mycelium.

Sacch. anomalus Hansen optræder med smaa ovale og pølsedannede Celler, der nærmest ligne Torula-Former. I Ølurt giver den Gjæring under samtidig Dannelse af Frugtæther, og paa Overfladen udvikler den meget hurtigt en mat, graa Hinde. Efter nogen Tids Forløb vil man finde Endosporer baade i Hindens og i Bundgjærens Celler. En Ejendommelighed, hvorved denne Art udmærker sig, er, at den optræder med hatformede Sporer. Den Mængde

Alkohol eller Æther, som den danner i Urt, er yderst ringe. Efter 11 Døgn udviste saaledes Ebullioskopet ved Undersøgelse af Urten, hvori den var bleven dyrket, et Kogepunkt svarende til et Indhold af 0,9 Vol % Alkohol, efter 8 Maaneder derimod kun svarende til 0,6 Vol %. Hvorvidt dette Resultat udelukkende eller delvis skyldtes Dannelse af Alkohol undersøgtes ikke. Kulturerne havde henstaaet ved c. 15° C. I Maltoseopløsninger fremkaldte den ingen Gjæring. Til Prøve for Invertin dyrkede jeg denne Art i 10 % Saccharoseopløsninger 18—48 Timer ved Værelsets Temperatur; jeg fandt da, at de reagerede neutralt, og at de gave en meget svag Reduktion af Fehling's Vædske, hvorimod f. Ex. Sacch. Pastorianus I i denne Opløsning under de samme Forhold gav en stærk Reduktion. Hvis denne Art overhovedet formaar at udsondre Invertin, saa maa man, ifølge ovenstaaende Forsøg, slutte, at denne Evne i hvert Fald maa være tilstede i meget ringere Grad end hos andre bekjendte Saccharomyceter.

Da Hansen, som ovenfor nævnt, beskrev de saaledes omtalte tre Arter, vare ingen nærstaaende Former kjendte. Iblandt de hidtil undersøgte Saccharomyceter indtoge de en ejendommelig og skarpt karakteriseret Stilling; de ere nemlig Typer for helt nye Grupper indenfor denne Slægt. Hvis man ønskede at indføre nye Navne, vilde der Intet være til Hinder for at opstille dem som Repræsentanter for tre nye Slægter. Ved Offentliggjørelsen af hans Afhandlinger blev Interessen hos forskjellige Forskere vakt for Studiet af disse Former, og man begyndte at søge efter dem. Det lykkedes da ogsaa temmelig hurtigt at finde flere nye Varieteter eller Arter, som slutte sig nær til Sacch. membranaefaciens og Sacch. anomalus. Først i den nyeste Tid er en Art bleven funden, som staar Sacch. Ludwigii nær, nemlig den af P. Lindner under Navnet Schizosaccharomyces Pombe bekrevne.

Efter en af J. Koehler i V. Hefte af »Mittheilungen Oesterr. Versuchsstation für Brauerei und Mälzerei, Wien«, 1892, offentliggjort Afhandling har han i urent Brøndvand fundet en Gjærform, som han anser for identisk med Sacch. membranaefaciens Hansen, idet de af Hansen angivne Karakterer ogsaa findes hos Koehlers Art. Desuden meddeler han om sin Art, at den giver Sporer ved 25° C. efter 41 Timer, ved 9° C. efter 10 Døgn. De sidstnævnte Bestemmelser af Koehler stemme dog ikke med de af mig med Sacch. membranaefaciens Hansen gjorte (se nedenfor). Hindedannelsen, som hos den af Koehler bekrevne Art

først kommer efter 3 Døgn ved 25° C., har jeg hos Hansens Art desuden iagttaget allerede efter 1 Døgn.

I »Annali della R. Scuola di Viticoltura e di Enologia in Conegliano«, Serie III, Fasc. II, 1892 (Ref. i Botan. Centralblatt Bd. LIV, 1893, p. 9) har Dr. P. Pichi beskrevet og afbildet to nye Arter, som slutte sig meget nær til Hansens Sacch. membranaefaciens. Differenserne ere kun smaa, men da han har haft sidstnævnte Art til Sammenligning i originale Exemplarer fra Hansen selv, maa det antages, at de ere tilstrækkelige til at adskille de tre Arter. Om Sporernes Udvikling ved forskjellige Temperaturer meddeler Pichi intet. Han fandt den ene af sine Arter paa Evonymus Europaeus, den anden i Vingjær.

Former, der slutte sig om Hansens Sacch. anomalus, ere i den senere Tid gjentagne Gange blevne fundne, f. Ex af Dr. P. Lindner og Zeidler i Berlin, Dr. H. Will i München, samt i Direktør Alfred Jørgensens Laboratorium i Kjøbenhavn, hvor Laboratorieforstander Just Chr. Holm flere Gange har iagttaget forskjellige Saccharomyceter med hatformede Sporer. Hansen fandt sin Art første Gang i en uren Bryggerigjær fra München; senere er den her i Carlsberg Laboratoriet iagttaget paa modne Blommer. Af de ovennævnte Forskere er den funden i en belgisk Bryggerigjær, i Gjærbundfaldet fra Øl, paa Grønmalt og i gjærende Althæasaft, samt paa Kirsebær, hensatte til Selvgjæring. Om disse Former ere identiske eller kun beslægtede med Hansens Sacch. anomalus er det for Øjeblikket umuligt at afgjøre, da ingen af de nævnte Forskere give en nærmere Beskrivelse af de af dem iagttagne Former. For at en Sammenligning med Udbytte kan finde Sted, vil det ogsaa have Betydning yderligere at søge efter nye Karakterer for de af Hansen opstillede Arter.

I sin Afhandling fra 1883 om Askosporedannelsen hos Slægten Saccharomyces (Carlsberg Laboratoriets Meddelelser II. Bd., p. 29) har Hansen vist, at Temperaturkurverne for Sporernes Udvikling hos de forskjellige Arter vel have væsentlig samme Form, men at Kardinalpunkterne, navnlig de af Maximums- og Minimumstemperaturerne betingede, give os karakteristiske Skjelnemærker til Adskillelse af Arterne. Senere Forskere have bekræftet Rigtigheden heraf. Gjentagne Gange har Hansen advaret imod den Misforstaaelse, der ikke sjeldent er fremkommen, at denne Karakter for sig alene skulde være tilstrækkelig til at bestemme Saccharomyces-Arterne. Hansen har tilmed selv udfundet en hel Række andre Karakterer fra forskjellige Omraader.

Laboratorieforstander Monal, ansat ved den i Forbindelse med Universitetet i Nancy nylig oprettede Bryggerskole, studerede her i Laboratoriet i Oktober 1892 og paabegyndte i Forening med mig en Undersøgelse over Sporernes Udviklingsgang hos de tre ofte nævnte Arter. Dette Arbejde, som imidlertid paa Grund af Monals Bortrejse hurtigt blev afbrudt, optog og fuldførte jeg selv alene derefter i Vinteren 1892—93.

Til disse Undersøgelser bleve de tre Arter dyrkede i Ølurt. Efter at jeg ved 20—24 Timers Dyrkning ved 26° C. havde avlet unge og kraftige Celler, bleve disse derefter udsaaede paa Gibsblokke, og naar Blokkene havde suget sig fulde med Vand, saa at deres Overflade viste sig svagt glindsende, bleve de stillede ind i Thermostaten ved de ønskede Temperaturer. Jeg fulgte kort sagt den af Hansen i hans sidstnævnte Afhandling angivne Fremgangsmaade. Som de efterfølgende Tabeller vise, anvendte jeg for alle tre Arter en Række af forskjellige Temperaturer fra 35° C.—3° C. og benyttede dertil hovedsagelig Panums Thermostat. I Overensstemmelse med Hansens Fremgangsmaade bleve ikke de modne Sporer, men de første tydelige Anlæg benyttede ved Tidsbestemmelserne for Udviklingen. For hver Temperatur er som Regel anvendt 4—6 Forsøgsrækker, og de i Tabellerne angivne Tal ere Middeltal af disse.

Resultatet af mine Undersøgelser var følgende:

Sacch. membranaefaciens. Hansen.

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Ved | 35° C. | ingen Udvikling af Sporer. | | | |
| — | 33—33½° C. | Anlæg efter | 19—21 | Timers Forløb. | |
| — | 32½° C. | — | 18 | — | |
| — | 30½—31° C. | — | 17—18 | — | |
| — | 30° C. | — | 17—18 | — | |
| — | 28° C. | — | 17¼—18 | — | |
| — | 25° C. | — | 17¼—18 | — | |
| — | 7½—8½° C. | — | 4½—5 | Døgn. | |
| — | 6—7½° C. | — | 6—7 | — | |
| — | 2½—3° C. | ingen Udvikling af Sporer. | | | |

Ved 35° C. og 2½—3° C. fandt der altsaa ingen Sporedannelse Sted. Maximumstemperaturen for Sporedannelsen var ved 33—33,5° C., Minimumstemperaturen ligger mellem 3—6° C. og Optimumstemperaturen nær 30° C.

Koehler fandt, som foran bemærket, at Sacch. membranaefaciens ved 25° C. først danner Sporer efter 41 Timer og ved 9°

først efter 9 Døgn. Ifølge mine ovenstaaende Undersøgelser fandt jeg, at Sporedannelsen indtraadte meget tidligere. Efterat jeg havde afsluttet mine Undersøgelser, har min Kollega, Hr. Assistent, Cand. Kløcker godhedsfuldt meddelt mig, hvorledes han har fundet en, som det synes mig, naturlig Forklaring til den Differens, der er mellem Koehlers og mine Resultater. Koehler havde til sine Forsøg benyttet de af Wichmann anbefalede Lerblokke, jeg, som anført, de haardtstøbte Gibsblokke, der her i Laboratoriet og anden Steds almindelig anvendes til saadanne Undersøgelser. Kløcker udsaaede Celler, stammende fra samme Vegetation af Sacch. membranaefaciens samtidig paa de nævnte Ler- og Gibsblokke og under de selvsamme Forhold.

Et første Forsøg med noget svækkede Celler gav som Resultat, at der efter 18 Timers Henstand ved 25° C. hverken fandtes Sporer paa Gibsblokkene eller Chamotteblokkene; efter 24 Timer vare derimod saadanne udviklede paa Gibsen, medens der endnu ingen fandtes paa Leret. Først efter 65 Timers Forløb fandtes ganske enkelte paa det sidstnævnte Substrat.

Det andet Forsøg anstilledes med en ung og kraftig Vegetation, avlet efter den af Hansen angivne Forskrift, men iøvrigt paa samme Maade. Efter 18 Timers Forløb fandt Kløcker Sporer paa begge Gibsblokkene, omend kun faa, altsaa i Overensstemmelse med min Iagttagelse, derimod ingen paa Lerblokkene. Endnu efter 24 Timer saaes ingen paa de sidstnævnte. Efter 41 Timer var der paa den ene Lerblok en rigelig Mængde, ligesaa paa begge Gibsblokkene; den anden Lerblok udviste kun meget faa.

Paa Lerblokkene kom Udviklingen altsaa i alle Tilfælde betydeligt senere end paa Gibsblokkene. Da Kløcker kom til det samme Resultat som jeg, naar han, ligesom jeg, anvendte Gibsblokke, og til det samme Resultat som Koehler, naar han, ligesom denne, anvendte Lerblokke, maa jeg nærmest deraf drage den Slutning, at Koehler og jeg have arbejdet med den samme Art, men at Differensen imellem hans og mine Undersøgelser stammer fra den forskjellige Forsøgsanordning. Det ses heraf, hvor vigtigt det er ved den Slags Forsøg at arbejde paa samme Maade.[1])

---

[1]) Allerede for et Par Aar siden udførte jeg en stor Række sammenlignende Forsøg med forskjellige Lerblokke, som vare lavede paa Bings Porcellainsfabrik i Kjøbenhavn. De fleste af disse Blokke gave et meget daarligere Resultat end Gibsblokkene; kun eet Sæt

Sacch. Ludwigii. Hansen.

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Ved | 34° C. | ingen Udvikling af Sporer. | | | |
| — | 32—32 1/2° C. | Anlæg efter | 19—21 | Timers Forløb. | |
| — | 30 1/2—31° C. | — | 18—20 | — | |
| — | 30° C. | — | 18—19 | — | |
| — | 28° C. | — | 19—20 | — | |
| — | 25° C. | — | 20—21 | — | |
| — | 7 1/2—8 1/2° C. | — | 7—8 | Døgn. | |
| — | 6—7 1/2° C. | — | 13—14 | — | |
| — | 2 1/2—3° C. | ingen Udvikling af Sporer. | | | |

Sacch. anomalus. Hansen.

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Ved | 34° C. | ingen Udvikling af Sporer. | | |
| — | 32—32 1/2° C. | Anlæg efter | 19—21 | Timers Forløb. |

af dem gav i det Hele et ligesaa godt. Prøverne bleve gjorte med Sacch. Pastorianus I Hansen. Da jeg forlod Carlsberg Laboratoriet, fortsatte Hr. Kløcker disse Forsøg og har godhedsfuldt stillet de af ham erholdte Resultater til min Raadighed. I »Centralbl. f. Bakteriologie u. Parasitenkunde«, 1893, anbefaler Wichmann og Elion at anvende Lerblokke (henholdsvis »Chamotteblöcke« og »Thonwürfel«) istedetfor Gibsblokke. Kløcker anstillede derfor en stor Række sammenlignende Forsøg med de to nævnte Forfatteres Lerblokke og de almindelige Gibsblokke. De bleve foretagne aldeles under de samme Omstændigheder og med den selv samme Gjærvegetation, saa at man med Sikkerhed kunde henføre den Forskjel, der viste sig, alene til Blokkene. Han anstillede sine Forsøg med Hansens to Arter: Sacch. ellipsoïdeus II og Carlsberg Undergjær Nr. 2. Paa Wichmanns Chamotteblokke udviklede Sporerne sig altid senere og i et langt ringere Antal end paa Gibsen, altsaa samme Resultat som ovenfor omtalt med Sacch. membranaefaciens. Elions »Thonwürfel« stillede sig gunstigere; der var i de nævnte Henseender ingen væsentlig Forskjel mellem dem og Gibsblokkene.

Sporedannelsen er ligesom enhver anden Funktion underkastet Svingninger. Disse betinges ikke blot deraf, at Cellernes Tilstand kan vexle, men ogsaa deraf, at Forsøgsanordningen ikke altid nøjagtig er den samme. Har man f. Ex. en større Række Blokke, saa vil den ene ikke forholde sig aldeles som den anden; nogle ville være gunstigere for Sporeudviklingen end andre. Herved fremkommer der altsaa ogsaa Svingninger. Kløcker fandt nu i sine Forsøg, at disse gjennemgaaende vare mindre for Gibsblokkene end for Lerblokkene, ogsaa naar Sammenligningen foretoges med de bedste Lerblokke. Der er følgelig ingen Grund til at opgive Gibsblokkene.

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Ved | $30^{1}/_{2}$—$31^{0}$ C. | Anlæg efter | 18—19 | Timers Forløb. |
| — | $30^{0}$ C. | — | 17—19 | — |
| — | $28^{0}$ C. | — | $17^{1}/_{2}$—19 | — |
| — | $25^{0}$ C. | — | 18—20 | — |
| — | $7^{1}/_{2}$—$8^{1}/_{2}{}^{0}$ C. | — | 7 | Døgn. |
| — | 6—$7^{1}/_{2}{}^{0}$ C. | — | 13—14 | — |
| — | $2^{1}/_{2}$—$3^{0}$ C. | ingen Udvikling af Sporer. | | |

Sammenligne vi de foranstaaende Temperaturkurver for de tre Arter, finde vi, at Maximumstemperaturen for Sporedannelsen ligger noget højere hos Sacch. membranaefaciens end hos de andre to, medens den hos disse er den samme. Optimumstemperaturen er omtrent ens for dem alle tre og noget højere end hos de fleste af de af Hansen undersøgte Arter. Ved nærmere at betragte Temperaturkurverne for Sacch. Ludwigii og Sacch. anomalus, vil man ved de lave Temperaturer $7^{1}/_{2}$—$8^{1}/_{2}$ og 6—$7^{1}/_{2}{}^{0}$ C. finde, at en Differens af 1—2 Grader i Temperaturen har givet en Differens af 5—6 Døgn for Dannelsen af Sporeanlæggene. Hvad Minimumstemperaturen angaar, ligger denne formodentlig for Sacch. Ludwigii og Sacch. anomalus i Nærheden af $6^{0}$ C., for Sacch. membranaefaciens sandsynligvis lidt lavere. Ved $3^{0}$ C. indtraf i intet Tilfælde Udvikling af Sporer hos nogen af Arterne. En nøjere Bestemmelse i denne Del af Kurven var mig ikke mulig, da Temperaturer mellem 3 og $6^{0}$ C. ikke vare til min Raadighed; formentlig vil Nøjagtigheden ogsaa være tilstrækkelig for Øjemedet. Den største Interesse knytter sig i hvert Fald til den øvrige Del af Kurven.

Sacch. Ludwigii og Sacch. anomalus give os Exempler paa, at Arter, som i ren morfologisk Henseende ere skarpt adskilte (Sporernes og de vegetative Cellers Form og Sporernes Spiring ere jo, som det erindres, tydeligt forskjellige), desuagtet kunne fremvise væsentlig de samme Temperaturkurver for Sporernes Udvikling. De Undersøgelser, der for andre Arters Vedkommende foreligge af Hansen, Will, Grønlund og Andre vise, at det Modsatte dog ogsaa kan indtræde, nemlig, at Arter, som ikke ved morfologiske Karakterer kunne skjelnes fra hverandre, netop i den nævnte Retning kunne frembyde store Differenser.

Da Hansen optog disse tre Arter i sine Undersøgelser, var det ikke, fordi han ønskede at beskrive nogle nye Species, men fordi de paa flere Maader gave interessante morfologiske og biologiske Oplysninger. Man kan ogsaa uden Overdrivelse sige, at

de i den Henseende ere de mærkværdigste Saccharomyces-Arter, der hidtil ere blevne undersøgte. Da der nu, som foran berørt, omkring de af Hansen opdagede Typer har samlet sig en hel Kreds af nye Arter og Varieteter, har det Betydning fra saa mange Sider som muligt at søge Karakterer for disse Arter. Mit Arbejde er et Bidrag i den Retning, og jeg har særlig dvælet ved Sporernes Udviklingsgang, fordi denne Analyse i den Henseende hører til de vigtigste.

---

# Undersøgelser over Eddikesyrebakterier.

(Anden Afhandling).

Af

Emil Chr. Hansen.

## 1. Historisk Indledning.

I Literaturen over Eddikesyrebakterierne er der to Værker, som særlig tildrage sig vor Opmærksomhed, det ene af Kützing, det andet af Pasteur. Det var paa et for Mikrobiologien vigtigt Tidspunkt, da Kützing i 1837 udgav sine »Mikroskopiske Undersøgelser over Gjær og Eddikemoder.«[1]) Kort forinden var det nemlig ved de epokegjørende Undersøgelser af Cagniard Latour og Theodor Schwann blevet vist, at Alkoholgjæren bestaar af levende Celler, og at det er disse, der fremkalde Alkoholgjæringen.

I den nævnte Afhandling gav Kützing en Beskrivelse og Afbildning af en Eddikesyrebakterie. P. 390 beskriver han den som bestaaende af meget smaa Kugler, der undertiden syntes at være lejrede i Rækker, men som for det Meste laa mellem hverandre uden bestemt Orden; i alle Tilfælde vare de dog indhyllede i Slim. Han saa, at Eddikemoderen voxede, og hans Iagttagelse førte ham til det Resultat, at paa samme Maade som Alkoholgjæringen skyldes Gjæren, saaledes skyldes den »sure Gjæring« Eddikemoderen. Det Sidste var forøvrigt paa den Tid almindeligt anerkjendt i Praxis, idet man nemlig planmæssigt benyttede smaa Stykker af Eddikemoderen til Udsæd i den Vædske, som man ønskede at faa omdannet til Eddike.

---

[1]) Kützing, Microscopische Untersuchungen über die Hefe und Essigmutter. (Journal für praktische Chemie, Jahrg. 1837, Zveiter Bd., p. 385.)

Kützing betragter saavel Alkoholgjæren som Eddikemoderen som Organismer, der formere sig og udføre et bestemt kemisk Arbejde; naar de en Gang ere fremkomne, kunne de ligesom enhver anden Organisme ved Udsæd formeres. Men han begaar den Fejl at mene, at de kunne fremstaa ved Selvdannelse (generatio æqvivoca), og i den Henseende havde han altsaa en helt anden Anskuelse end Schwann. Denne viste nemlig ved sine Experimenter med Alkoholgjæren, at Spallanzani havde Ret, da han hævdede, at der ikke fandt Selvdannelse Sted.

Kützing kaldte den af ham opdagede Organisme for Ulvina aceti og udgav den i den 11te Decade af sine »Algæ aqvæ dulcis«. Beskrivelsen deraf gjentager han i sine »Grundzüge der philosophischen Botanik«, II Bd., 1852. Trods det Ufuldkomne i Kützings Undersøgelser, vise de dog tydeligt, at han virkelig har iagttaget en af de Bakterier, der fremkalde Eddikesyredannelsen. Forsaavidt er hans Arbejde altsaa banebrydende; det havde for den Tid, da det blev trykt, en stor Betydning.

I 1852 udkom en experimental Undersøgelse af Robert D. Thomson over Eddikemoderen.[1]) Han erholdt denne, idet han til en Sukkeropløsning satte Gjær og lidt Brød. Efter 3 Maaneders Forløb var der dannet en velsmagende Eddike som den, der i England paa den Tid blev anvendt i Husholdningen, og paa Bunden af Glasset fandtes nu en rigelig Mængde af en gelatinøs Dannelse, hvilken han efter en mikroskopisk Undersøgelse bestemte som Kützings Ulvina aceti. »Det er den samme Organisme«, siger han, »som ogsaa kaldes Mycoderma aceti«. Hvilke Forfattere han hermed sigter til, har jeg ikke kunnet udfinde.

Thomson mener ved sine Forsøg at være kommet til det Resultat, at Mycoderma aceti i en Sukkeropløsning (her tænkes vistnok paa almindeligt Rørsukker, som det gaar i Handelen) ikke blot fremkalder Dannelsen af Eddikesyre, men tillige af Alkohol og Kulsyre. Hans Iagttagelser viste ham, at Eddikesyredannelsen foregik langsommere, naar Eddikemoderen befandt sig i det underste Lag af Vædsken, end naar den var paa Overfladen af denne og her kom i direkte Berøring med Luften. Den Alkoholdannelse, som han iagttog, maa vel nærmest tilskrives de Gjærceller, hvormed hans Eddikemoder vistnok var blandet. Evne til at danne Alkohol er forøvrigt almindelig hos Mikroorganismer, ogsaa hos

[1]) Robert D. Thomson, Ueber die Natur und die chemischen Wirkungen der Essigmutter. (Annalen der Chemie und Pharmacie, 83 Bd. 1852, p. 89.)

Bakterier; men iblandt Eddikesyrebakterierne er der hidtil ikke fundet Exempler derpaa.

Et betydeligt Fremskridt paa dette Omraade skete først en halv Snes Aar derefter, da Pasteur udgav sine Studier over Eddikesyregjæringen og Eddikefabrikationen.[1])

Ifølge Pasteur fremkaldes Eddikesyredannelsen af en Mikroorganisme, der bestaar af korte Stave, som i Reglen ere lidt indsnevrede paa Midten og ordnede i Kjæder. Paa Grund af Indsnevringen kan det ofte se ud, som om man havde smaa Kugler for sig. Han giver en god Afbildning heraf og beskriver tillige Formeringen, der finder Sted, idet hver Stav ved den fortsatte Indsnevring deler sig i to smaa Kugler, som derpaa voxe ud og atter dele sig paa samme Maade. Direkte Iagttagelse paa Mikroskopbordet af det enkelte Individs Udvikling har han dog ikke. At der maa være en Slimmasse tilstede, som omgiver Cellerne, slutter han deraf, at de ere ordnede i Kjæder og dog indbyrdes adskilte ved Mellemrum; hvis Slimmassen ikke var der, vilde Kjædernes Led nemlig skilles ad. Den ovenstaaende Beskrivelse og Afbildning gjentager han i sin Bog »Études sur la bière«, 1876, hvor han p. 5 omtaler Øllets Eddikesyrebakterier.

Det af Kützing indførte Slægtsnavn Ulvina ombyttede Pasteur ligesom hans Forgænger Thomson med Navnet Mycoderma. Han viser hen til, at Persoon allerede i 1822 skal have beskrevet en saadan Mikroorganisme under Navn af Mycoderma aceti. Dette beror dog, som jeg i min nedenfor nævnte Afhandling meddelte, vistnok paa en Fejltagelse, thi jeg har intetsteds i Persoons Værker kunnet finde dette Navn. Persoon er den Botaniker, der har opstillet Slægten Mycoderma, og i »Mycologia europæa«, Sectio prima, 1822, p. 96 beskriver han Mycoderma mesentericum. Muligvis er det dette Navn, hvorpaa Pasteur tænker. Persoon beskriver dog kun Udseendet af de Hinder, der i Almindelighed danne sig paa Overfladen af saadanne Vædsker som Øl og Vin, naar de udsættes for Luftens Paavirkning. Om disse Hinders Celle-Indhold giver han ingen Oplysning, og det er ikke usandsynligt, at Mycoderma mesentericum snarere har Hensyn til de Hinder, der ere dannede af de

[1]) Pasteur, Études sur le vinaigre. Paris, 1868. I denne Bog findes aftrykt hans »Mémoire sur la fermentation acétique« fra »Annales scientifiques de l'École Normale supérieure«. T. 1, 1864. En kort Meddelelse om disse Undersøgelser gav Pasteur allerede i 1862 i Pariserakademiets Skrifter.

Svampe, som i en senere Periode bleve kaldte Saccharomyces Mycoderma, Mycoderma cerevisiæ og Mycoderma vini. Saadanne Hinder kunne som bekjendt dog ogsaa indeholde helt andre Organismer. Da Persoons Beskrivelse ikke hviler paa en mikroskopisk Undersøgelse, er det naturligvis aldeles umuligt at vide, hvad han egentlig har ment. Den Første, der gav en kjendelig Afbildning og Beskrivelse af en Eddikesyrebakterie er, som foran fremhævet, Kützing. Pasteur har ikke havt Øje for dette Fremskridt; han bryder nemlig Staven over sin Forgængers Arbejde og erklærer det rent ud for værdiløst. Det er imidlertid ikke som Historieskriver, at Pasteur har vundet sin Berømmelse. Det af Thomson og ham indførte Navn, Mycoderma aceti, blev i flere Aar almindeligt anvendt.

Pasteur lod sig ikke nøje med at give en Beskrivelse af Vegetationen, men han anstillede tillige en stor Række Forsøg dermed. Udsæden hertil fik han i nogle Tilfælde ved blot at tage lidt almindelig Eddike, hvori Cellerne fandtes. I andre Tilfælde skete det ved en foregaaende Dyrkning, idet han f. Ex. satte lidt Eddikesyre til Vin. Han havde nemlig iagttaget, at under disse Omstændigheder blev den sædvanlige Konkurrent, Mycoderma vini, undertrykt, og det Samme gjaldt ogsaa om de Bakterier, som almindelig optræde i Vinen. Mycoderma aceti regner han ikke til Bakterierne. I Eddikefabrikerne havde han tillige lært, at temmelig høje Varmegrader ere gunstige for dens Udvikling. Som Exempel paa de Blandinger, som han særlig benyttede, angiver han følgende: 1 Vol. almindelig rød eller hvid Vin med 2 Vol. Vand og 1 Vol. Eddike; eller: 1 Vol. Øl, 1 Vol. Vand og $^1/_2$ Vol. Eddike. Naar saadanne Vædsker bleve henstillede ved en ikke for lav Temperatur, udviklede der sig i Reglen en Hinde derpaa, som bestod af Mycoderma aceti, ogsaa naar man ikke havde foretaget nogen Udsæd deri.

Han havde iagttaget, at Mycoderma vini hyppigt optræder sammen med Mycoderma aceti; Mycoderma vini er nemlig en Art, som man ved en simpel mikroskopisk Undersøgelse altid med Sikkerhed kan skjelne fra Mycoderma aceti. Hans Bestræbelser gik nu ud paa fuldstændig at undertrykke den. »Den er«, siger han, »en Fjende for Mycoderma aceti, en slem Ukrudtsplante«, og han mener, at Tilsætningen af Eddikesyre beskjærmer Mycoderma aceti mod den.

Af Pasteurs hele Fremstilling fremgaar det, at han har havt den Opfattelse, at Eddikesyregjæringen skyldes een Art. De experimentale Undersøgelser, som jeg i 1879 offentliggjorde, gave

imidlertid Bevis for, at dette ikke forholder sig saaledes. Pasteurs Forsøg synes idetmindste i de fleste Tilfælde at være udførte med en eller flere af de Arter, der ere almindelige i Eddike, og som dels kunne optræde som Hinder, dels opfylde Næringsvædsken med en gelatinøs og sejg, bruskagtig Masse. Der forekommer dog ogsaa Angivelser, som kunne tyde paa, at han i sine Kulturer tillige har havt Bakterier, henhørende til de Arter, der udmærke sig ved hurtigt at danne en tynd Hinde paa Næringsvædskens Overflade og som ikke ved at neddykkes i denne kunne udvikle de ovenfor omtalte ejendommelige Zoogloeamasser. Det maa erindres, at Pasteur udførte sine Forsøg for tredive Aar siden, og at der den Gang endnu ikke var Tale om at fremstille Renkulturer af Mikroorganismer. Det Højeste, hvad der med nogen Sikkerhed kunde opnaas ved de Fremgangsmaader, som han anvendte, var, at Kulturerne kun kom til at indeholde saadanne Bakterier, som fremkalde Eddikesyregjæring, og selv dette var ikke altid sikkert; men om han i sine Forsøg arbejdede med eet eller med flere Species, derom kunde han slet Intet vide.

Kützing havde, som vi have hørt, allerede i 1837 givet en i det Hele god morfologisk Fremstilling af en Eddikesyrebakterie, og hans Iagttagelser havde ført ham til den Opfattelse, at det var den, der fremkaldte den »sure Gjæring«, som han benævner den. Fyldestgjørende Beviser for, at det virkelig forholdt sig saaledes, gav han dog ikke.

De smukke Forsøg af Davy, Döbereiner og Liebig viste, at porøse Legemer saasom meget findelt Platin, kunne fortætte Luftens Ilt og fremkalde en Iltning af Alkohol, saa at der dannes Eddikesyre og Vand. Disse Forsøg havde tillige givet en dybere Forstaaelse af, hvorledes denne Omdannelse foregaar. Kemikerne med Liebig i Spidsen vilde derfor i Almindelighed slet ikke indrømme, at ogsaa mikroskopiske Væsener ved deres Livsvirksomhed kunne fremkalde en lignende Omdannelse. Den foran nævnte Thomson gjør dog en Undtagelse. Liebig gav en rent kemisk-fysisk Forklaring af de Forhold, der f. Ex. finde Sted i Eddikefabrikerne. Efter hans Mening bliver Eddikesyredannelsen der fremkaldt ved Hjælp af et kvælstofholdigt, organisk Legeme, der atter under Luftens Indvirkning med Lethed gjennemgaar Forandringer, kemiske Bevægelser, og meddele disse til Vædsken. Dette Legeme skal ved Eddikesyredannelsen virke paa samme Maade som Platinsort, og saaledes, mener han, virke ogsaa Høvlspaanerne ved den tydske Snareddikefabrikation (Schützenbachs »Schnellessigfabrikation«). Efter denne Methode lader man den

Vædske, der skal omdannes til Eddike, risle over Høvlspaaner eller andre Legemer med stor Overflade, idet man samtidig sørger for, at der er en stærk Tilførsel af Luft.

Paa dette Punkt tog Pasteur fat med hele sin Kraft, og ved sine skarpsindige Experimenter beviste han, at Liebig havde miskjendt Mikroorganismernes Betydning. Hvad Spørgsmaalet om Spaanerne angik, kom han til det Resultat, at de for sig alene ikke formaa at fremkalde Eddikesyredannelse. Naar vinaandholdige Vædsker under Luftens Paavirkning blive omdannede til Eddikesyre, saa er det bestandigt levende Celler af Mycoderma aceti, som foraarsage dette, og ligemeget hvad enten denne Dannelse af Eddike foregaar i Fabrikerne, altsaa under en vis Kontrol, eller ved hvad man plejer at kalde en Selvgjæring, uden Menneskets Indgriben, nemlig naar Vædsker, som de nævnte, blive overladte til sig selv. Mycoderma aceti er allevegne udbredt i Luftens Støv; den tager overalt fat, hvor den kan komme til, og formerer sig med stor Hurtighed, naar Ernæringsforholdene blot ere nogenlunde gunstige.

Paa et Par Steder i sit Værk udtaler han den Opfattelse, at Eddikebakterierne virke paa samme Maade som det findelte Platin. P. 99 fremhæver han saaledes, at han ikke tilskriver Mycoderma-Hinden en fysiologisk Rolle. »Jeg tror«, siger han, »at dens Evne til at overføre Luftens Ilt til Alkohol, Eddikesyre o. s. v. er begrundet i dens særegne Struktur«. Om hvad det er i Strukturen, der skal betinge denne Egenskab, giver han dog ingen Oplysning. Forskjellen mellem Liebigs og Pasteurs Opfattelse er hovedsagelig den, at den Førstnævnte ikke blot tilskriver det fintdelte Platin, men ogsaa andre livløse Legemer Evne til at fremkalde den omtalte Iltningsproces. Pasteur anerkjender ingen andre livløse Legemer, end det fintdelte Platin, som værende i Stand til at fremkalde Eddikesyredannelse; hvor denne ellers finder Sted, sker det ved den Iltning, som foraarsages af de levende Celler af Mycoderma aceti. Angaaende selve Processen synes han derimod i det Væsentlige at have den samme Opfattelse som Liebig; klart udtaler han sig ikke herom.

Pasteurs Forsøg viste, at Mycoderma aceti ikke blot danner Eddikesyre, Vand og Kulsyre, men tillige andre Stoffer, navnlig Aldehyd og vistnok ogsaa Ravsyre. Saalænge der er Alkohol tilstede, bliver væsentlig kun denne iltet, men naar der ikke findes mere deraf i Vædsken, saa er det Eddikesyren, som forbrænder; herved omdannes den til Vand og Kulsyre. Sætter man paany Alkohol til Vædsken, da er det den, der strax bliver iltet

og omdannet til Eddikesyre, hvorimod den tilstedeværende Eddikesyre nu faar Lov til at være i Fred. Den mikroskopiske Plante, hvormed vi her beskjæftige os, formaar altsaa at angribe ikke blot Alkoholen, men ogsaa den Eddikesyre, som den selv har dannet, og den foretager et Udvalg.

Vi have hermed erholdt et Overblik over de vigtigste af Pasteurs theoretiske Undersøgelser paa dette Omraade og set hvilken Række af betydningsfulde Resultater, de bragte; endnu betydningsfuldere komme de til at staa for os, naar vi tænke paa, at disse Undersøgelser bleve udførte for over tredive Aar siden.

I det Foregaaende blev det omtalt, at Mycoderma vini hører til de Organismer, som kunne fremkalde Forstyrrelser i Eddikefabrikerne; dette gjælder i endnu højere Grad om Eddikeaalen. Denne Orm kan ofte optræde i store Masser i de Foustager, i hvilke Eddikesyregjæringen foregaar; navnlig var den idetmindste paa Pasteurs Tid en slem Plage i de Fabriker, som efter Orleans-Methoden eller den gamle franske Methode fabrikerede Vineddike. Ligesom Mycoderma aceti trænger den til megen Luft og søger derfor op til Vædskens øverste Lag; der opstaar herved en Konkurrence mellem de to Organismer. Hertil kommer, at Ormene ogsaa ved deres Bevægelser kunne forstyrre Hinden, saa at større eller mindre Partier deraf synke til Bunds. Da nu den kraftige Eddikesyredannelse er betinget af, at Overfladen af vedkommende Vædske (her tænkes paa Orleans-Methoden) er fuldstændig dækket med en kraftig Hinde, saa forstaas det let, at disse Orme kunne volde megen Forstyrrelse. Pasteur giver en udførlig Fremstilling af Eddikeaalens Kamp med Mycoderma aceti. At det ogsaa er ubehageligt at have den i den færdige Eddike forstaar sig af sig selv.

Det var disse Ormes Optræden, som for en væsentlig Del bevirkede, at Pasteur kom ind paa at udarbejde en ny Fremgangsmaade til Fabrikation af Eddike; særlig, mente han, at den skulde træde istedetfor den ovennævnte orleanske. Efter denne gamle franske Methode foregaar Gjæringen i Foustager, der vel indeholde forholdsvis tykke Vædskelag, men som dog ikke ere helt fyldte. Med passende Mellemrum tapper man en vis Portion Eddike af og sætter en lignende Portion Vin til. Eddikesyredannelsen foregaar temmelig langsomt, og de samme Foustager blive paa den beskrevne Maade benyttede flere Aar igjennem uden helt at tømmes og altsaa ogsaa uden at renses.

Principet i Pasteurs Fremgangsmaade bestaar deri, at han anvender flade Kar istedetfor Foustagerne. Vædskelaget i disse

Kar har i Modsætning til, hvad der finder Sted ved Orleans-Fremgangsmaaden, en ringe Tykkelse, men en forholdsvis meget større Overflade, altsaa de gunstigste Forhold for Udviklingen af Mycoderma-Hinden. Under disse Omstændigheder vil Iltningen foregaa med stor Kraft, naar der er sørget for tilstrækkelig Tilførsel af Luft og for en passende Varmegrad. Eddikesyredannelsen finder paa denne Maade meget hurtigere Sted end i Foustagerne, og Eddikeaalene faa ikke Lejlighed til at udvikle sig. Paa Grund af den hurtige Produktion er hvert Kar ogsaa kun en kort Tid i Arbejde; de kunne derfor hyppigere renses end de orleanske Foustager. Naar Fabrikationen er i Gang, tager Pasteur sin Udsæd fra en eller anden af de Hinder, som allerede findes i de andre Kar. Skal man derimod begynde, saa forskaffer han sig den ønskede Vegetation ved at udsætte en Vædske, som indeholder Alkohol og lidt Eddikesyre, f. Ex. den ovenfor omtalte Blanding af Vin og Eddike, for Luftens direkte Paavirkning. Ved god Udsæd forstaar han en saadan spontan Vegetation, som er i kraftig Udvikling og som under Mikroskopet viser sig at bestaa af lange Kjæder og ikke af Granulationer. Dette er det Væsentlige i Pasteurs Fremgangsmaade, saaledes som han selv beskriver den i Slutningen af sit Værk fra 1868.

Ved Omtalen af Wurms nedenfor anførte Meddelelse vil jeg atter komme tilbage dertil. Paa dette Sted ville ogsaa de Grunde blive undersøgte, hvorfor Pasteurs Fremgangsmaade ikke fandt Indgang i Praxis.

Den berømte svenske Kemiker Scheele havde i 1782 meddelt en Methode til at gjøre Eddike holdbar, nemlig ved at opvarme den. Et Halvhundrede Aar derefter anvendte Appert den samme Fremgangsmaade med Hensyn til Øl og Vin. Pasteur citerer disse Forfattere og giver et udførligt Referat af Scheeles Opfindelse, som han nøje har prøvet og nu paa en kraftig Maade anbefaler. Denne Opvarmningsmethode har som bekjendt faaet en meget stor praktisk Anvendelse. I Skrifter fra Halvfjerdserne kaldes den den Appert-Pasteurske; siden have Pasteurs Elever udelukkende knyttet hans Navn dertil. Med Urette blev Scheeles Navn skudt til Side. Vi heroppe i de skandinaviske Lande have særlig Grund til atter at drage det frem.[1])

[1]) En udførligere Meddelelse om disse Forhold findes i min historiske Fremstilling: »Hvorledes Læren om Sygdomme i gjærede Vædsker efterhaanden har udviklet sig«. (Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet. III Bd. 2 Hefte, 1892, p. 166, og i »Untersuchungen aus der Praxis der Gärungsindustrie«, München 1892, 2tes Heft, p. 42.)

I 1873 udgave Knieriem og Mayer nogle Undersøgelser, som slutte sig til de foranstaaende af Pasteur.[1]) De gjøre heri først opmærksom paa, at det findelte Platin ikke virker under de samme Omstændigheder som Mycoderma aceti, omend selve Iltningsprocessen i begge Tilfælde foregaar paa samme Maade. I Eddikefabrikerne kan man ikke arbejde med en stærkere Alkoholblanding end paa 10 %, hvorimod det nævnte porøse Legeme med største Lethed ilter Alkohol, som har en meget stærkere Koncentration. Denne Iltning kan ogsaa foregaa ved højere Varmegrader, naar man anvender Platinsort dertil, end naar man anvender Mycoderma aceti. Endelig er Produktet, som man erholder, naar Iltningsprocessen udføres ved Hjælp af det findelte Platin, ikke aldeles det samme i kemisk Henseende som det, man faar ved at lade Mycoderma aceti udføre dette Arbejde.

I Overensstemmelse med Pasteur fandt de, at Høvlspaaner, Filtrerpapir og lignende Stoffer ikke formaa at fremkalde Eddikesyredannelse.

En Hovedopgave for disse Forskere var det om muligt at faa afgjort, om denne Gjæring skyldes en fysiologisk Virksomhed af Mycoderma aceti eller om den, som Liebig og vel ogsaa Pasteur mente, er en rent kemisk-fysisk. De anstillede derfor deres Forsøg med Hinder af Mycoderma aceti, i hvilke Cellerne vare blevne dræbte ved Opvarmning; om en Livsvirksomhed kunde der altsaa ikke længere være Tale, og da der ikke traadte kjendelige Differenser frem i Hindernes Struktur efter denne Behandling, saa antoge de, at det stillede Spørgsmaal paa denne Maade maatte kunne afgjøres. Da de nu udførte deres Forsøg med disse døde Hinder under Forhold, der ellers vare gunstige for Eddikesyregjæring, fik de det Resultat, at denne slet ikke indtraadte. Heraf drage de den Slutning, at denne Gjæring paa det Nøjeste er knyttet til de mikroskopiske Væseners Livsvirksomhed og ikke er en simpel kemisk-fysisk Proces. De meddele dog Intet om, hvorledes Eddikesyregjæringen foregaar. Her foreligger endnu den Dag i Dag en interessant Opgave, som venter paa sin Løsning.

De udtale den rigtige Opfattelse, at Mycoderma aceti maa regnes til Bakterierne. I Slutningen af Afhandlingen vise de hen til den Mulighed, at der maaske findes forskjellige Bakterier, som kunne bevirke, at Alkohol omdannes til Eddikesyre, men de have dog forgjæves søgt efter saadanne Arter. De gaa ud fra, at de i

[1]) Knieriem und Mayer, Ueber die Ursache der Essiggährung. (Die landwirthschaftlichen Versuchsstationen, XVI Bd., 1873, p. 305.)

deres Forsøg have arbejdet med een Art, nemlig med Pasteurs Mycoderma aceti, og de give i alt Væsentligt en lignende Beskrivelse deraf som Pasteur.

Det næste Arbejde, som vi derefter træffe, blev udgivet af en tydsk Kemiker Pfund og gaar fornemmelig i praktisk Retning.[1]) Han gjennemgaar deri temmelig udførligt den tydske eller saakaldte »Schnellessigfabrikation«.

At Pasteurs Fremgangsmaade paa den Tid var prøvet i enkelte Fabriker i Tydskland, kan man se af de Angreb, som Pfund retter derimod. Han skildrer paa en ironisk Maade, hvorledes en Kemiker, som var gjennemtrængt af Pasteurs Lærdomme, ved at anvende disse kom godt paa Vej til fuldstændigt at ødelægge en Eddikefabrik, som tidligere havde været i god Drift.

Pfund fandt kun paa saadanne Steder i Fabrikerne en kjendelig Vegetation af Eddikebakterier, hvor Vædsken i tynde Lag havde rigelig Adgang til Luft. Paa Spaanerne i de Foustager, hvor Eddikesyredannelsen foregik, fandt han dem dog ikke, og han er tilbøjelig til at mene, at de slet ikke behøves, naar man arbejder efter denne Methode. Hans Iagttagelser kunne i hvert Fald tydes paa den Maade, at Bakterierne maa spille en underordnet Rolle. Vi hørte, at Mayer og Knieriem ligesom Pasteur kom til det modsatte Resultat.

I et Referat (Botan. Jahresber. Jahrg. 1874, p. 341), som Mayer gav af Pfunds Afhandling, nærmer han sig noget til dennes Opfattelse, idet han indrømmer, at Pasteurs Undersøgelser ikke formaa at forklare den Proces, der foregaar i Snareddikefabrikationen. Nye Forsøg ere her meget ønskelige.

Enhver, der har havt Lejlighed til at underkaste Spaanerne i disse Fabriker en mikroskopisk Undersøgelse, vil ogsaa være bleven forundret over det ringe Antal af Bakterier, som der findes. Endog i de Tønder, hvor Eddikesyredannelsen foregaar med Kraft, kan man kun med den største Møje opdage nogle faa af dem. Den tilstedeværende Vegetation synes kort sagt slet ikke at staa i noget rimeligt Forhold til den Produktion af Eddikesyre, der finder Sted. Hvor forskjellig herfra er ikke i den Henseende Orleans-Methoden og Øl-, Spiritus- og Vinfabrikationen med den store Avl af Mikroorganismer!

Paa det Punkt, hvortil Forskningen nu var kommen, maatte det særligt blive Opgaven at underkaste Eddikesyrebakterierne selv

[1]) Paul Pfund, Theorie und Praxis der Schnellessigfabrikation. (Dinglers polyt. Journal, 211 Bd., Jahrg. 1874, p. 280.)

en mere indgaaende botanisk Undersøgelse, end det hidtil var sket. Et Bidrag i den Retning offentliggjorde jeg i Slutningen af 1878 i min Doktordisputats. Næste Aar blev det aftrykt i Carlsberg Laboratoriets Tidsskrift.[1])

Mine Undersøgelser gave nye Oplysninger i to Retninger; de viste nemlig, at der under Navnet Mycoderma aceti skjultes mindst to tydeligt adskilte Arter, og at disse Arter optraadte med en meget stor Formrigdom.

Det var Hindernes forskjellige Forhold overfor Jod eller Jod-Jodkalium, som lærte mig, at der i hvert Fald maatte være to Arter tilstede. Hinderne gave nemlig under disse Omstændigheder

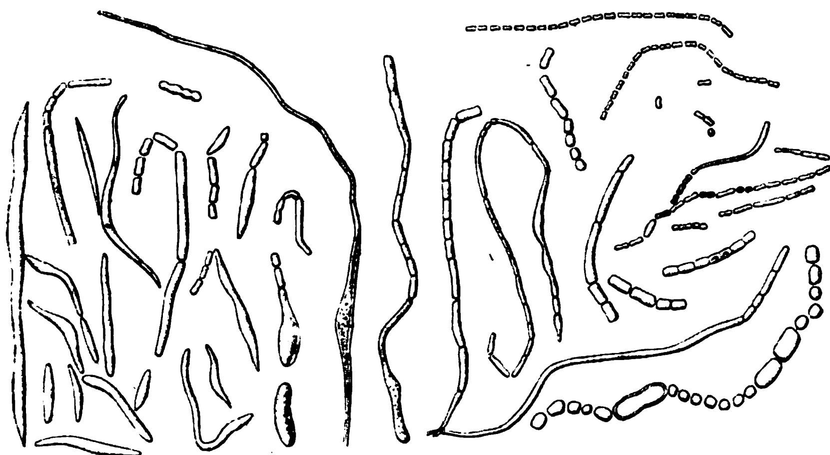


Fig. 1.

henholdsvis gul og blaa Reaktion. De Vegetationer, som reagerede paa den førstnævnte Maade, betegnede jeg med det gamle Navn Mycoderma aceti, de andre med det nye Artsnavn Mycoderma Pasteurianum efter min berømte Forgænger.

Foruden de af Kützing og Pasteur beskrevne Kjæder af smaa Stavbakterier, fandt jeg hos disse Arter tillige lange Stave og meget lange Traade, der vare rette eller snoede paa forskjellig Maade, og endelig opsvulmede Celler i de mest forskjellige Skikkelser, kort sagt den største Mangfoldighed. Hosstaaende Fig. 1

[1]) Emil Chr. Hansen, Mycoderma aceti (Kütz.) Pasteur og Mycoderma Pasteurianum nov. sp. (Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet, I Bd. 2 Hefte, 1879, p. 275.)

er en Gjengivelse af de Afbildninger, hvoraf min ovennævnte Afhandling er ledsaget.

Jeg fandt begge Arter i Øl; Mycoderma Pasteurianum dog kun i Hvidtøl og Dobbeltøl, det vil sige overgjærede Ølsorter med forholdsvis stor Extrakt- og ringe Alkoholmængde. For at erholde Renkulturer af dem anvendte jeg følgende Methode: Aabne Bægerglas, der vare $^{3}/_{4}$ fyldte med undergjæret Lagerøl eller med de nævnte overgjærede Ølsorter, bleve stillede ind i en Thermostat ved en Temperatur i Nærheden af 34° C. Jeg havde nemlig gjort den Iagttagelse, at disse Vædskers Overflade under de nævnte Omstændigheder blev bedækket med en Hinde, der ved den mikroskopiske Undersøgelse i Reglen saa ud til kun at bestaa af Eddikesyrebakterier. Mycoderma aceti optraadte saa at sige altid i Lagerøllet og ikke sjældent tillige i de nævnte overgjærede Ølsorter. Mycoderma Pasteurianum iagttog jeg den Gang kun i de sidste og her langt fra altid. Fra disse Hinder blev et Spor overført i sterile Næringsvædsker, der vare skjærmede mod Infektion udenfra. Dyrkningen blev bestandig foretagen ved den ovennævnte gunstige Temperatur og gjentoges nogle Gange. I de talrige Udsaaningsforsøg, som jeg anstillede med de to Arter, hver for sig, i Parallelrækker, fik jeg bestandig en Vegetation af Mycoderma Pasteurianum, for saa vidt denne var udsaaet, og i modsat Fald af Mycoderma aceti. Dette var ikke blot et Tegn paa, at jeg havde opnaaet at fremstille Renkulturer af mine Eddikesyrebakterier, men tillige at de virkelig maatte opfattes som forskjellige Arter. Til Dyrkningen bleve ikke blot de nævnte Ølsorter, men ogsaa Ølurt anvendt. Begge Arter dannede kraftige Vegetationer paa disse Vædskers Overflade. I Øllet fremkaldte de en stærk Eddikesyredannelse.

Hinderne, som bleve dannede ved Varmegrader mellem 30 og 34° C. eller ved almindelig Stuevarme, bestode hovedsageligt af Kjæder med deres smaa Stavbakterier; men ved nøjere Eftersyn fandtes næsten altid tillige, skjøndt i underordnet Indblanding, de andre af mig iagttagne Former (se Fig. 1). Spørgsmaalet, om disse indbyrdes saa forskjellige Skikkelser virkelig hørte sammen i een Udviklingsrække, søgte jeg at faa besvaret ved de beskrevne Forsøg. Disse viste, at det forholdt sig saaledes. Ogsaa naar jeg tog en Udsæd, som udelukkende bestod af de typiske Kjæder, udviklede der sig dog Hinder, som indeholdt den store Mangfoldighed af forskjellige Skikkelser. I morfologisk Henseende forholdt de to Arter sig væsentlig ens. Ved Kulturer i fugtige Kamre paa Mikroskopbordet iagttog jeg, hvorledes Stavene ved Deling for-

merede sig; efter en Sporedannelse spejdede jeg derimod forgjæves. Der fandtes vel Led i Kjæderne, som vare mere glindsende end de øvrige, ligeledes stærkt lysbrydende Korn i enkelte Celler, men de optraadte ikke paa en saadan Maade, at de kunde opfattes som Sporer.

Paa den Tid, da min Afhandling udkom, var Spørgsmaalet om Pleomorfismen hos Bakterierne paa Dagsordenen. De fleste Forskere, som toge Del i denne Diskussion, indskrænkede sig imidlertid til at meddele mikroskopiske Iagttagelser af Formerne, som de frembøde sig i de Vegetationer, der lejlighedsvis forefandtes, og som gjorde Indtryk af at være tilstrækkelig rene. Der blev herved hovedsageligt bygget paa et mere eller mindre usikkert Skjøn. Mine ovenstaaende Undersøgelser høre til de første experimentale Beviser, der bleve givne for, at een og samme Art kan optræde med en hel Række meget forskjellige Former. Rigtigheden deraf blev senere bekræftet af De Bary (Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozoen und Bacterien, 1884), Zopf (Die Spaltpilze, 1884), Adrian I. Brown (se de i det Følgende omtalte Afhandlinger) og Andre. Nye Bidrag blev der til Dato ikke givet i den Retning. I sit System henfører Zopf Eddikesyrebakterierne til Slægten Bacterium, hvilken Betegnelse ogsaa er at foretrække for Navnet Mycoderma.

Et Aar efterat min foran nævnte Afhandling udkom, offentliggjorde Wurm en Beretning om nogle Forsøg, som han havde anstillet i en Eddikefabrik i Breslau.[1]) Efter Pasteurs Fremgangsmaade benyttede han Trækar, i hvilke Vædskens Overflade var stor i Forhold til dens Dybde. Vædsken bestod af Eddike, Vand og Alkohol, samt en ringe Mængde af de af Pasteur angivne mineralske Næringssalte. Karrene vare tildækkede med Laag, og Lufttilførslen skete gjennem smaa Huller i Sidevæggen. Saavel Vædskens som Rummets Varmegrad var omkring 30° C. Paa denne Vædske udsaaede han lidt af en Hinde, der var dannet af Eddikesyrebakterier. Efter 12—36 Timer var hele Overfladen dækket dermed. Vegetationen heri havde ikke altid det samme Udseende; han iagttog tre forskjellige Former, nemlig smaa, kuglerunde Celler, Mikrokokker, en Bacillusform og lange, opsvulmede Traade, men fremhæver, at det ikke var ham muligt at afgjøre, om disse forskjellige Former tilhørte eet eller flere Species. Sine mikroskopiske Undersøgelser anstillede han i F. Cohns Laboratorium. Denne

[1]) Emanuel Wurm, Ueber Essigbildung mittels Bakterien. (Dinglers polyt. Journal, 235 Bd., Jahrg. 1880, p. 225.)

berømte Bakterieforsker havde ogsaa selv gjort lignende Iagttagelser som Wurm, men ligeledes uden at kunne komme til Klarhed over, hvorledes Sammenhængen var. At jeg over et Aar i Forvejen havde underkastet dette Spørgsmaal en experimental Undersøgelse, er undgaaet deres Opmærksomhed. Muligvis har Wurm havt en lignende Udviklingsrække for sig som den, jeg havde beskrevet; ligesaa rimeligt er det ogsaa, naar man ser hen til den ufuldkomne Maade, hvorpaa hans Kulturer bleve anstillede, at der har været flere Arter tilstede, og at disse ikke en Gang alle have hørt til Eddikesyrebakteriernes Gruppe.

Wurms Fremgangsmaade var i alt Væsentligt den af Pasteur angivne. Som særlige Fordele derved fremhæver han den hurtige Produktion, der opnaas; den siges at være dobbelt saa hurtig som efter Snareddikefabrikationen. Eddikeaalene faa ikke Tid til at formere sig i kjendelig Grad, da Karrene ikke staa længere end 10—15 Dage, hvorefter de tømmes og altsaa ogsaa kunne renses. »Naar man«, siger Wurm, »blot sørger for, at Udsæden ikke tages fra et Kar, hvor Ormene findes, vil det være let helt at undgaa dem«. 2 Vol. % Alkohol gave 1,7—1,8 % Eddikesyre. Om Produktets Beskaffenhed gives ingen Oplysning.

Først i Slutningen af sin Meddelelse berører han de Vanskeligheder, som den nye Fremgangsmaade fører med sig. Hvis man ikke paa rette Maade sætter Alkoholen til Karrene, naar Gjæringen er i Gang, saa vil denne ikke blot blive hæmmet, men endog kunne blive helt standset. Paa et tidligere Sted giver han den Meddelelse, at Tilsætningen af Alkohol først maa ske, naar der er $^1/_2$—$^1/_8$ % Alkohol tilbage i Vædsken; ogsaa maa man lægge Mærke til, at den Vædske, der kommer i Berøring med Bakterie-Hinden, ikke maa indeholde ret meget over $^1/_2$ % Alkohol.

Wurm mener, at Pasteurs Fremgangsmaade vil være særlig heldig ved Fabrikationen af Vineddike, og han henviser i den Henseende til Breton-Laugiers Meddelelse om de Forsøg, som denne har anstillet i Orleans. (Dinglers polyt. Journal, 201 Bd., Jahrg. 1871, p. 67.) Breton-Laugier anvendte flade Kar paa 125 Liter, som bleve fyldte med en Blanding af Eddike og klar Vin; paa Overfladen af denne Vædske blev der ved Hjælp af en Træspatel forsigtigt anbragt en ung Hindevegetation saaledes, at den bredte sig ud paa Vædskens Overflade og ikke sank ned under denne. Spatelen maa derfor i Forvejen være gjort fugtig, for at Hinden let kan slippe. Rummets Varmegrad var 20—25° C. Efter 9—10 Døgn var den tilstedeværende Alkohol omdannet til Eddike. I samme Tid blev der produceret 7 Gange mere Eddike

end efter Orleans-Fremgangsmaaden, men den nye Eddike var ikke saa aromatisk.

Da jeg for et Aars Tid siden forespurgte mig hos Sagkyndige i Breslau om, hvad der var kommen ud af Wurms Forsøg, blev der svaret mig, at de ikke have ført til Noget. For mine tekniske Studier havde det Interesse at erholde nærmere Oplysning om Anvendelsen af Pasteurs Fremgangsmaade i Praxis. Mine Forespørgsler saavel i Frankrig som i Tydskland gave imidlertid kun et negativt Resultat. Det var mig ikke muligt at faa Adressen paa en eneste Fabrik, hvor denne Fremgangsmaade anvendes. Jeg maa heraf slutte, at den slet ingen Indgang har fundet. Tilberedningen af den berømte Vineddike i Frankrig foregaar bestandig efter den gamle Orleans-Methode, og i andre Lande er det hovedsagelig den ofte omtalte tydske Snareddikefabrikation (Schützenbachs »Schnellessigfabrikation«), som anvendes. Foruden disse to Methoder benyttes vel ogsaa andre, men de have ikke den Betydning som disse.

Pasteurs Methode er væsentligt at betragte som en Ændring af den orleanske, og i flere Henseender synes den at være en virkelig Forbedring af denne. De theoretiske Undersøgelser, hvorpaa han byggede sin Fremgangsmaade, ere, som vi foran have hørt, betydningsfulde; det Spørgsmaal stiller sig da frem: Hvad er Aarsagen til, at hans Methode ingen Indgang kunde finde i Praxis? Ved at gjennemgaa Literaturen paa dette Omraade er jeg kommen til følgende Opfattelse. Grunden til, at man, hvor man ønsker en hurtig Produktion, bestandig foretrækker den tydske Fremgangsmaade, uagtet det siges, at man ved Hjælp af Pasteurs skal kunne arbejde endnu hurtigere, maa vistnok søges i de særlige Vanskeligheder og dermed følgende større Krav til nøjagtig Pasning, som Pasteurs Methode kræver.

Og nu Orleans-Methoden: Hvad der hos den fra een Side set vel er en Mangel, nemlig den langsommere Gjæring, det er paa den anden Side netop det, som giver denne Methode sin særlige Betydning; thi det er Grunden til, at man erholder en Vineddike med fin Bouket og behagelig Smag. Ved Pasteurs Fremgangsmaade blev dette ikke opnaaet. Det er altsaa forstaaeligt, at ogsaa Fabrikanterne i Frankrig holde fast ved den gamle, prøvede Fremgangsmaade trods dens Mangler. Ogsaa her gjør det sig endvidere gjældende, at Pasteurs Methode stiller større Krav til nøjagtig Pasning, og da der ikke arbejdes med en rendyrket Udsæd, undgaar man altsaa desuagtet ikke de Svingninger, som den ukjendte Udsæd kan føre med sig.

Wurm gik ikke videre i sine Fordringer til Udsæden end Pasteur; han betragter den som ren, naar den er fri for Eddikeaal, Mycoderma cerevisiæ og Mycoderma vini. Den Tanke at foretage et planmæssigt Udvalg af en bestemt gunstig Art eller Race var den Gang endnu slet ikke kommen frem i Gjæringsindustrien. Der er nu hengaaet over ti Aar, siden jeg indførte dette Princip paa Alkoholgjæringens Omraade, men i Eddikefabrikationen er der fremdeles intet Fremskridt sket i den Henseende; man lader her den Dag i Dag ligesom tidligere det blinde Tilfælde sørge for Gjæringerne.

Der er dog meget, der taler for, at man ved at arbejde med en Renkultur af en udvalgt Art, ikke blot vil kunne opnaa større Sikkerhed i denne Fabrikation end hidtil, men tillige en hurtig Gjæring og et fint Produkt. At der gives et stort Antal indbyrdes meget forskjellige Eddikesyrebakterie-Arter, som ligeledes vise Forskjel i Henseende til deres fysiologiske Virksomhed, vide vi nu. Skulde det da ikke være tænkeligt, at man deriblandt kunde finde nogle, som ogsaa efter den hurtige Fabrikationsmethode skulde kunne give et fint Produkt som den berømte orleanske Vineddike? I saa Fald vilde meget være vundet herved; men blot den større Sikkerhed, som Rendyrkningen giver, vil allerede være et kjendeligt Fremskridt. Jeg har dvælet saa længe ved disse tekniske Spørgsmaal, fordi jeg ønskede at gjøre opmærksom paa de Opgaver, som ligge for, og som paa det Standpunkt, hvortil Forskningen nu er kommen, vistnok ogsaa kunne løses.

Paa samme Tid, som Wurm udgav sine foran omtalte tekniske Undersøgelser, udkom en lille Afhandling af Boutroux[1]), hvori der meddeles, at Mycoderma aceti vel i en alkoholholdig Næringsvædske danner Eddikesyre, men at den i en Opløsning af Glykose i Gjærvand derimod danner Sukkersyre. Dette Sidste sker ogsaa ved en simpel Iltningsproces. Boutroux havde i en tidligere Afhandling opfattet den sidstnævnte Syre som Mælkesyre; dette erklærer han nu selv at være en Fejltagelse. I den foreliggende Afhandling henfører han den Bakterie, som i hans Forsøg i det ene Tilfælde dannede Eddikesyre, i det andet Sukkersyre, til Mycoderma aceti. Senere er han ifølge Bourquelots Lærebog, »Les fermentations«, kommen til det Resultat, at den dog er forskjellig fra den og maa opfattes som en særegen Art, Micrococcus

---

[1]) Boutroux, Sur une fermentation nouvelle du glucose. (Comptes rendus. 91 T., 1880. p. 236.)

oblongus. Afhandlingen, hvori han foretager denne Ændring, har jeg ikke kunnet erholde.

En Række betydningsfulde kemiske Undersøgelser bleve i Aarene 1886 og 1887 offentliggjorte af Adrian I. Brown.[1]) Han udførte sine Forsøg med Renkulturer i sterile Vædsker. Den ene af de to Arter, hvormed han experimenterede, stammede fra en Hinde paa Overfladen af Øl og blev bestemt som Bacterium aceti. Den udviklede de af mig beskrevne Former og gav gul Reaktion med Jodopløsning. I en Blanding af 5 % Æthylalkohol med Gjærvand fremkaldte den en kraftig Dannelse af Eddikesyre, og denne var den eneste flygtige Syre, der kunde paavises. Som det erindres havde Pasteur vist, at Eddikesyre under Bakteriernes Indvirkning forbrænder til Kulsyre og Vand, naar der ikke længere findes Alkohol i Vædsken. Rigtigheden heraf blev ligeledes bekræftet af Brown.

Han anstillede derpaa en Række Forsøg for at erfare, om Bact. aceti ogsaa kan fremkalde en lignende Iltning af andre Alkoholer. Det viste sig da, at normal Propylalkohol blev iltet til Propionsyre, men at hverken Methylalkohol, primær Isobutylalkohol eller Amylalkohol gjennemgik nogen Omdannelse.

I Overensstemmelse med Boutroux fandt han, at Bact. aceti ved Iltning kan omdanne Druesukker til Glukonsyre. Paa Rørsukker, Frugtsukker, Mælkesukker og Stivelse havde den derimod ingen Indvirkning.

Det interessanteste Resultat, som Browns Undersøgelser bragte, er dog, at der som Hovedprodukt af den Iltningsproces, der fremkaldes af Bact. aceti i en Opløsning af Mannit, fremkommer Lævulose. Den Mannit, hvormed han anstillede sine Forsøg, stammede fra Manna; man kan imidlertid som bekjendt ligeledes fremstille Mannit ved at behandle Dextrose med Natriumamalgam. I sine nye Undersøgelser fra 1887 viser Brown, at ogsaa den paa sidstnævnte Maade fremstillede Mannit forholder sig overfor Bact. aceti som den af Manna fremstillede. Ved disse smukke Forsøg have vi det altsaa i vor Magt at omdanne Dextrose til Lævulose.

---

[1]) Adrian I. Brown, The chemical action of pure cultivations of Bacterium aceti. (Journal of the Chem. Society, Vol. XLIX, 1886, p. 172.) — On an acetic ferment which forms cellulose, (sammesteds, p. 432.) — Further notes on the chemical action of Bact. aceti, (sammesteds, 1887, p. 638.) — Note on the cellulose formed by Bact. xylinum, (sammesteds, p. 643.)

Paa det sidstnævnte Sted meddeler han endvidere, at Bact. aceti kan omdanne Glycol til Glycolsyre og Glycerin til Kulsyre og Vand. Bact. aceti voxede med stor Kraft i en Opløsning af 5 % ren Glycerin i Gjærvand i selve Vædsken. Efter hans Beskrivelse maa jeg antage, at der ingen Hinde blev dannet.

I det Foregaaende have vi set, at der er en vis Lighed i den Maade, hvorpaa Platinsort og Bact. aceti virke paa Æthylalkohol, men ogsaa Forskjelligheder, som fremhævet af Mayer og Knieriem. Brown giver flere Exempler paa, at Eddikesyrebakterierne ere ude af Stand til at ilte visse kemiske Forbindelser, som derimod iltes af Platinsort, og paa, at de Produkter, der dannes, naar Platinsort og Eddikesyrebakterier virke paa den samme Forbindelse, ere forskjellige. Vistnok med Rette mener han, at ogsaa overfor Æthylalkohol er det kun en udvortes, tilsyneladende Lighed, der finder Sted i den Omdannelsesproces, der fremkaldes af Platinsort og af Bakterier, og at disse ogsaa i dette Tilfælde arbejde paa en anden Maade end Platinsort. I den Henseende er han altsaa, ligesom Mayer og Knieriem, ikke enig med Liebig og Pasteur.

I den anden af de foran nævnte Afhandlinger beskriver Brown den saakaldte »vinegar plant«. Den optræder dels som en gelatinøs Masse, dels som en sejg, tyk Hinde. Han antager, at det er denne Dannelse, som almindeligt kaldes »Eddikemoder«. I Literaturen er dog dette Navn ligeledes knyttet til de tynde, skrøbelige Hinder, som f. Ex. de to af mig beskrevne Arter af Eddikesyrebakterier danne. »The vinegar plant« benyttes endnu hyppigt paa Landet flere Steder i England, hvor Beboerne selv lave den Eddike, som de bruge. Et større eller mindre Stykke af den bliver anbragt i en Opløsning af almindeligt brunt Sukker. Paa Grund af de Alkoholgjærsvampe, der følge med Sukkeret, indtræder der først en Alkoholgjæring, og naar denne omtrent er forbi, danne Eddikesyrebakterier en Hinde paa Vædskens Overflade og begynde Iltningsprocessen.

Denne Art blev ligesom Bact. aceti dyrket i rene Kulturer og i sterile Næringssubstrater. Den bestod i Almindelighed af korte Stavbakterier, der i Rækker laa indesluttede i en stærkt udviklet gelatinøs Masse, som var gjennemsigtig og strukturløs. Sjeldnere optraadte den med lange Traade; opsvulmede Celler, der vare hyppige hos Bact. aceti, iagttog Brown ikke. Hinderne, som dannede sig paa Overfladen af en Næringsvædske, sank let ned under Overfladen; dette havde da kun til Følge, at der voxede

et nyt Lag ovenpaa det gamle. Paa den Maade kan der udvikles et større Antal Lag, og med Tiden blive de meget sejge, næsten som Skindlapper. Under de mest forskjellige Dyrkningsforhold dannede den bestandig de beskrevne ejendommelige Hinder. De Hinder, som Bacterium aceti dannede, vare under alle Omstændigheder tydeligt forskjellige derfra, idet de nemlig vare forholdsvis tynde, noget slimede og let skiltes ad. Zoogloeadannelsen hos de to Former viste kort sagt en ejendommelig Forskjel. Allerede dette bevirkede, at Brown maatte opfatte dem som to vel adskilte Arter. Han meddeler imidlertid tillige en hel Række andre Karakterer, hvorved den ene tydeligt kan skjelnes fra den anden. Hans Undersøgelser have ikke blot en systematisk, men tillige en stor biologisk Interesse.

Zoogloeamassen hos den nye Art gav ved Behandling med koncentreret Svovlsyre og Jod eller med Klorzink-Jod en blaa Reaktion, og ved en nærmere kemisk Undersøgelse viste det sig ogsaa, at den hovedsagelig bestod af Cellulose. Han kaldte derfor sin nye Art Bacterium xylinum. Hos Bact. aceti var der derimod intet Spor at opdage af dette Stof. Bact. xylinum formaar at danne Cellulose saavel af Dextrose som af Mannit og Lævulose, derimod hverken af Stivelse eller af Rørsukker. Forøvrigt fremkalder den lignende kemiske Omdannelser som Bact. aceti.

Som Temperatur-Optimum angives 28°, som Temperatur-Maximum 36° C., men der meddeles intet om de nærmere Betingelser. Under Dyrkning i Gelatine formaar den ikke, som saa mange andre Bakterier, at gjøre denne flydende.

Paa det Tidspunkt, hvortil vi nu ere komne, havde den bakteriologiske Teknik naaet en høj Grad af Fuldkommenhed; det var navnlig blevet forholdsvis let ved Hjælp af Kochs Pladekulturer med temmelig Sikkerhed at adskille Arterne fra hverandre og foreløbig at karakterisere dem ved de Forhold, som deres Vegetationer viste paa Næringsgelatine. En stor Mængde nye Arter, henhørende til forskjellige Afdelinger af Systemet, bleve nu paa denne Maade opstillede. Hertil høre ogsaa de Beskrivelser af Eddikesyrebakterier, som bleve offentliggjorte af Peters[1]) og Zeidler[2]). Peters beskrev een, Zeidler to Arter.

---

[1]) W. L. Peters, Die Organismen des Sauerteigs und ihre Bedeutung für die Brotgährung. (Botan. Zeitung, 1889, p. 405.)

[2]) A. Zeidler, Beiträge zur Kenntniss einiger in Würze und Bier vorkommender Bakterien. (Wochenschrift f. Brauerei, 1890, p. 1213.)

De to sidstnævntes Væxt paa Urt-Gelatine bevirker, at denne efter en Uges Tid bliver flydende; den ene kan tillige omdanne Øl til en slimet Vædske.

Vi skulle nu med et Par Ord omtale nogle Arbejder, som staa i et mindre direkte Forhold til vor Opgave end de foregaaende, nemlig af Giunti, Hirschfeld, Tolomei, Steinmetz, Alfred Jørgensen og Holm.

Giunti[1]) fandt, at ikke blot direkte Sollys, men ogsaa diffust Dagslys forhindrer Udviklingen af Bact. aceti, og han antager, at man heri har et Middel til at beskjærme Vinen mod Dannelsen af Eddikesyre; hans Plan lader sig dog næppe gjennemføre i den store Praxis.

Hirschfelds[2]) Forsøg gave blandt andet det Resultat, at en Tilsætning af 0,01—0,02 % Saltsyre paa en kraftig Maade fremskynder Eddikesyregjæringen, hvorimod en Tilsætning af 0,06—0,07 % standser den, dog uden at dræbe Bakterierne. 0,1 % Phosphorsyre har ligeledes en hæmmende Indvirkning. Siden 1881 er der fremkommen en stor Række Undersøgelser, som vise, at forskjellige Syrer under visse Omstændigheder udøve en pirrende Indflydelse paa Gjæringsorganismerne, saa at disse derved blive i Stand til at udføre et større kemisk Arbejde end ellers. Hirschfelds ovennævnte Iagttagelser ere et nyt Bidrag i den Retning.

Tolomei[3]) anstillede Forsøg over Elektricitetens Indvirkning paa Eddikesyregjæringen, idet han ved Hjælp af Ruhmkorff's Apparat lod Gnister springe hen over en Vædske, i hvilken en Eddikedannelse fandt Sted. Stærke Udladninger standsede Udviklingen af Bact. aceti, svage havde ingen Indvirkning derpaa.

Giuntis foran nævnte Forsøg gjentog han[4]) og kom til det Resultat, at den hæmmende Virkning, som Sollyset udøver paa Udviklingen af Bact. aceti, kun skyldes de kemisk virksomme Straaler.

---

1) M. Giunti, Sull' azione della luce sulla fermentazione acetica. (Staz. sperim. agrar. ital. T. XVIII, fasc. II.) Efter Kochs Jahresbericht, 1er Jahrg. 1890.

2) E. Hirschfeld, Ueber die Einwirkung des künstlichen Magensaftes auf Essigsäure- und Milchsäuregährung. (Pflügers Archiv f. die gesammte Physiologie, XLVII Bd., 1890, p. 510.)

3) G. Tolomei, Einwirkung der Elektricität auf die Essiggährung. (L'Orosi Vol. XIII, p. 401.) Efter Kochs Jahresbericht, 1er Jahrg. 1890.

4) G. Tolomei, Einwirkung des Lichtes auf die Essiggährung. (Staz. sperim. agrar. ital. T. XX, 1891, p. 380.) Efter Biedermanns Centralbl. 1891.

Steinmetz's[1]) nedenfor nævnte lille Meddelelse indeholder navnlig en Række almindelige Bemærkninger om Forretningsforholdene i Eddikeindustrien og Beskrivelse af nogle smaa tekniske Forbedringer, der i de senere Aar ere blevne indførte. Han har anstillet sine Iagttagelser i en af de største Fabriker i Tydskland (Fröhlich & Co., Zeitz), hvor Snareddikefabrikationsmethoden anvendes. Efter hans Mening er det en Blanding af forskjellige Arter af Eddikebakterier, der i denne Fabrikation fremkalde Alkoholens Omdannelse til Eddike; nogle af disse Arter producere Eddike med højt Procentindhold, andre med lavt; jo stærkere Eddike man ønsker at producere, jo mere Næring maa der sættes til Vædsken, for at Bakterierne skulle kunne udføre det store Arbejde. Naar Syremængden har naaet 14 %, dø de. Egentlige Undersøgelser har han næppe udført; han giver i hvert Fald ingen nærmere Oplysninger om disse forskjellige Arter. Og naar han paa flere Steder taler om, hvor vigtigt det er at foretage en »rigtig Dyrkning« af Fermentorganismerne, saa er det atter kun tomme Ord, thi han meddeler slet Intet om, hvorledes denne Dyrkning skal udføres.

I 3die Bind af nærværende Tidsskrift p. 33 har jeg omtalt, hvorledes Pasteur gjorde et forgjæves Forsøg paa at rense Bryggerigjæren ved at behandle den med Vinsyre. Uagtet Principet, som ligger til Grund for denne Fremgangsmaade, er forfejlet, blev det dog ikke opgivet af Gjæringsteknikerne. Der blev snart anstillet Forsøg med et, snart med et andet kemisk Stof, men disse Bestræbelser holdt sig hidtil i Reglen i det Stille. Ofte traadte de kun frem som Recepter, der bleve falbudte de Industridrivende; særlig i Pressegjærfabrikationen har en saadan Handel altid blomstret. I den nyeste Tid er imidlertid en Belgier, Dr. Effront, traadt frem for Offentligheden med den Paastand, at Flussyre og Fluorsalte ikke blot ere gode Antiseptika, men at man ved Hjælp deraf ogsaa skal kunne befri Gjæren for tilstedeværende fremmede Organismer, saa at kun den gode Kulturgjær bliver tilbage. Han har udtaget en stor Række Patenter paa sin Fremgangsmaade. Imod den sidste Del af Effronts Paastande vende Alfred Jørgensens og Holms Undersøgelser sig.[2]) De viste,

[1]) O. Steinmetz, Neuerungen auf dem Gebiete der Essig-Industrie. (Chemiker Zeitung, XVI Jahrg., 1892, p. 1723.)

[2]) Alfred Jørgensen og Just Chr. Holm, Om Effronts Fremgangsmaade ved Rensning resp. Konservering af Gjæren ved Hjælp af Flussyre eller Fluorsalte. (Zymotechn. Tidsskr. 1892, Nr. 9—10.) En fransk Oversættelse af denne Afhandling findes i »Moniteur scientifique«, 1893, p. 179.)

at Effront paa dette Punkt har taget fuldstændigt fejl. Ved at anvende den af ham anbefalede Methode til Gjærens Rensning, opnaar man nemlig ingenlunde at faa en ren Kulturgjær, men begunstiger tvertimod Udviklingen af saadanne Mikroorganismer, som volde Skade i Bryggerierne og Brænderierne. Af praktisk Interesse for os paa dette Sted er, at til de skadelige Mikroorganismer, hvis Udvikling fremmes ved Effronts Fremgangsmaade, hører ogsaa Bact. aceti.

De efterfølgende to Arbejder af Lafar og Wermischeff ere begge udkomne i Løbet af 1893.

I Begyndelsen af sine Studier[1]) gjør Lafar opmærksom paa, hvor ringe vor Kundskab er til de Organismer, som spille en Rolle ved Eddikefabrikationen, og at dette især gjælder om Schützenbachs Snareddikefabrikation. Han har derfor stillet sig den Opgave i en Række Undersøgelser at ville bringe Klarhed paa dette Omraade. Begyndelsen gjøres med en Gjærsvamp, som giver en kraftig Eddikesyregjæring i vinaandholdige Vædsker. Den blev opdaget i Bærme fra et Bryggeri. Paa steriliseret Lagerøl udviklede den ved 25° C. en Vegetation, der lignede Vegetationer af Mycoderma vini og Mycoderma cerevisiæ. Den i Øllet dannede Eddike havde en behagelig Smag som god Vineddike. Efter 13 Døgn var der under de nævnte Omstændigheder dannet 1,098 g. Eddikesyre i 92,5 Kub.-Centim. af Øllet.

Om de Bakterier, som synes at være virksomme ved den ofte nævnte Snareddikefabrikation har Lafar i Efteraaret 1892 paabegyndt nogle Undersøgelser paa Carlsberg Laboratoriet. Han arbejder nu dermed i sit eget Laboratorium i Hohenheim og vil forhaabentlig snart kunne begynde at offentliggjøre sine Resultater.

Wermischeff[2]) synes at have stillet sig en lignende Opgave som Lafar, idet han henviser til den Usikkerhed, som hersker i Eddikefabrikationen, og til de der benyttede urene Kulturer, om hvis Sammensætning man Intet ved.

For at erholde Materiale til sine Undersøgelser udsatte han, ligesom Pasteur, en Blanding af Rødvin, Vand og Eddike for Luftens Paavirkning ved en Varmegrad mellem 20° og 22° C., og

---

[1]) Franz Lafar, Physiolog. Studien über Essiggärung und Schnell-Essigfabrikation. (Centralblatt f. Bakteriologie und Parasitenkunde, XIII. Bd, 1893, p. 684.)

[2]) Wermischeff, Recherches sur les microbes acétifiants. (Annales de l'Institut Pasteur, 1893, p. 213.)

der dannede sig da ogsaa en Hinde paa Vædskens Overflade. Ved Hjælp af Spredekulturer i Næringsgelatine udskilte han derpaa de forskjellige Eddikesyrebakterier, hvoraf den paa ovennævnte Maade erholdte Hindevegetation bestod. Kolonierne vare tydeligt forkjellige og lode sig henføre til sex Grupper. De sex forskjellige Vegetationer, som han saaledes havde erholdt fra den ene Hinde, fremkaldte alle en kraftig Eddikesyregjæring i Vin, men nogle bevirkede tillige, at den oprindelig klare Vædske blev uklar, medens de andre derimod ikke fremkaldte nogen Forandring i den Henseende; de førstnævnte dannede pulverformige Bundfald, de sidstnævnte enten kun tynde Hinder paa Overfladen eller tillige slimede Masser i selve Vædsken.

Om de 5 Grupper af Kolonierne mener han, at de trods deres forskjellige Udseende og trods Vegetationens forskjellige Forhold i den nævnte Vædske, dog vistnok udgjøre een Art.

Det mikroskopiske Billede var det samme i alle Tilfælde og stemte overens med de foran omtalte Afbildninger af Pasteur, altsaa smaa Stavbakterier, i Almindelighed ordnede i Kjæder. Den store Formrigdom, som jeg iagttog hos de to af mig i 1878 beskrevne Arter, fandt Wermischeff ikke, og med Jodopløsning gave hans Vegetationer ingen Reaktion. Skjøndt den Mulighed naturligvis ikke er udelukket, at der kan findes Arter, som kunne forholde sig saaledes, som han meddeler, er det dog ikke usandsynligt, at hans Vegetationer ved passende Dyrkning ogsaa vilde have kunnet udvikle lignende lange Traade og opsvulmede Former som de af mig iagttagne og ligeledes give gul Reaktion med Jod. Naar man kun har Kjædeformen for sig, indtræder nemlig denne Reaktion vanskeligst. Paa dette Sted skal jeg dog ikke dvæle længere herved, men henvise til det efterfølgende Kapitel. Wermischeff udtaler den Mening, at man ved at ryste de Kulturer, hvori de Vegetationer findes, som pleje at danne de tynde Hinder, hurtigt vil kunne bevirke, at de opgive Evnen til at udvikle sig paa Vædskens Overflade, men i Stedet derfor formere sig nede i Vædsken selv, saa at denne derved bliver uklar, og der dannes et pulverformigt Bundfald. Hvis dette var Tilfældet, vilde der altsaa ingen væsentlig Forskjel være mellem de af ham iagttagne Eddikesyrebakterier, der bevirkede, at Vinen blev uklar, og som optraadte som pulverformigt Bundfald deri uden Hindedannelse, og de Vegetationer, der netop dække Vinens Overflade med en Hinde og ikke fremkalde Uklarhed deri. Han omtaler disse Omdannelser som Noget, der følger af sig selv, men dog uden at give nøjagtig Oplysning om, hvorledes de foregaa.

For nogle Aar siden anstillede jeg talrige Forsøg i den samme Retning med Bact. aceti og Bact. Pasteurianum. Som Næringsvædske blev steriliseret Øl benyttet, og der blev experimenteret ved forskjellige Temperaturer. Skjøndt Forsøgene bleve fortsatte i lang Tid, indtraadte der dog ingen Omdannelse; de to Arter bevarede deres Evne til at danne Hinder paa Overfladen af den nævnte Vædske, og de fremkaldte ingen Uklarhed deri.

Vegetationen i den sjette Art af Kolonierne tilhører ifølge hans Undersøgelser derimod et helt andet Species, nemlig det, som Brown beskrev under Navnet Bact. xylinum.

Vi have hermed gjennemgaaet Literaturen over Eddikesyrebakterierne fra 1837, da de bleve opdagede af Kützing, og til Midten af 1893. Jeg skal nu gaa over til at give en Beretning om mine nye Undersøgelser.

I min Afhandling fra 1879 havde jeg paavist den store Formrigdom, hvormed Eddikesyrebakterierne kunne optræde, men Intet meddelt om, hvorledes den fremkom eller hvorledes disse mærkelige Skikkelser udviklede sig af hverandre. Jeg lovede at ville komme tilbage til dette og andre Spørgsmaal; det var imidlertid kun sjældent, at jeg i de nærmeste Aar fik Tid til at beskjæftige mig dermed. Nogle af de Resultater, hvortil jeg dog kom, meddelte jeg i de Forelæsninger, som jeg af og til har holdt her paa Laboratoriet. De ere med min Tilladelse blevne optagne i de tydske, engelske og franske Udgaver af Alfred Jørgensens Bog om Gjæringsorganismerne. Først i Aar er jeg naaet saa vidt, at jeg har kunnet bringe disse Undersøgelser til en Afslutning. Grunden til den lange Opsættelse er den, at jeg kom ind paa Undersøgelser over Alkoholgjærsvampene, som det havde større Betydning for mig at faa ført igjennem.

Forinden jeg slutter den foreliggende historiske Indledning, kan jeg endelig meddele, at jeg ved Naturforskermødet i Nürnberg i September (se »Berichte der deutsch. botan. Gesellschaft«, 1893) og i det Kgl. danske Videnskabernes Selskabs Møde den 17de November 1893 meddelte en Oversigt over de vigtigste Resultater, som findes i den udviklingshistoriske Del af mine i det Efterfølgende meddelte nye Undersøgelser.



## 2. Morfologiske og fysiologiske Undersøgelser.

**Undersøgelsesmethoden.**

Mine nye Undersøgelser bleve navnlig udførte med de to foran omtalte Arter: Bact. aceti og Bact. Pasteurianum og med en tredie Art, som jeg har kaldet Bact. Kützingianum efter Eddikesyrebakteriernes Opdager. Forsøgene bleve selvfølgelig bestandig udførte med absolute Renkulturer i sterile Næringssubstrater.

Ved flere Lejligheder har jeg i de Skrifter, som jeg siden 1881 har udgivet, fremhævet, at den eneste for alle Tilfælde sikre Vej til at opnaa en Renkultur af en Mikroorganisme er den at tage sit Udgangspunkt fra den enkelte Celle. Dette frembyder ikke nogen særlig Vanskelighed for den øvede Experimentator, naar Talen er om saa store og let kjendelige Celler som Alkoholgjærsvampene, og jeg har derfor ogsaa fuldstændigt gjennemført dette Princip i den Methode, som jeg har udarbejdet til Fremstilling af Renkultur af disse Svampe.

Meget vanskeligere bliver det derimod, naar Talen er om Bakterier. I mange Tilfælde vil der her ikke være Andet at gjøre end at anvende Kochs Pladekultur og stole paa, at man ved at gjentage Spredningen nogle Gange vil faa den ønskede Renkultur. Den Sikkerhed, som man har, naar man, som i min Methode, med Øjet følger Koloniernes Udvikling fra den enkelte Celle, opnaar man naturligvis ingensinde paa denne Maade. Eddikesyrebakterierne ere endnu saa let kjendelige, at den strenge Methode uden altfor store Vanskeligheder kan anvendes paa dem. Som de efterfølgende Afbildninger vise, har jeg ogsaa ved Dyrkning i det fugtige Kammer paa Mikroskopbordet Skridt for Skridt forfulgt Artens Udviklingshistorie, idet jeg gik ud fra enkelte bestemte Celle-Individer.

Til Fremstilling af Renkultur af Eddikesyrebakterier benyttede jeg, ligesom til Gjærsvampe, Böttchers fugtige Kammer og Urt-Gelatine, samt Dyrkning ved c. 25° C. Under disse Omstændigheder ere Kolonierne efter 3—4 Dages Forløb saa store, at de kunne benyttes som Udsæd i de Næringssubstrater, hvori man ønker at fortsætte Dyrkningen.

Der blev efterhaanden prøvet en meget stor Række Vædsker og Næringsgelatiner af forskjellig Sammensætning; iblandt disse viste Dobbeltøl sig at være det gunstigste Næringssubstrat. De fleste af de efterfølgende Experimenter bleve derfor ogsaa udførte

med denne Vædske, og hvor intet Andet siges, foregik Dyrkningen dermed i de saakaldte Freudenreichske Kolber. En saadan cylinderformet Kolbe rummer 22 Kub.-Centim., men blev kun halvt fyldt; Røret i dens Hætte blev lukket med Bomuld.

Dobbeltøllet er en overgjæret Ølsort, som er forholdsvis rig paa Extrakt og fattig paa Alkohol; efter Steriliseringen indeholdt det omkring 1 Vol. % Alkohol. Ret hyppigt blev der ogsaa anvendt undergjæret Øl, Lagerøl, hvilket efter Steriliseringen indeholdt 2,8 Vol. % Alkohol. Den anvendte Urt var almindelig, humlet Urt (c. 13 % Ball.). Kun undtagelsvis blev der brugt andre Næringsvædsker end de nævnte. Som fast Næringsbund benyttede jeg Urt-Gelatine, Dobbeltøl-Gelatine, Kjødvands-Pepton-Gelatine og Dobbeltøl-Agar-Agar; de to førstnævnte bestode henholdsvis af de ovenfor nævnte Næringsvædsker, Urt og Dobbeltøl, med en Tilsætning af 7 % Gelatine. Kjødvands-Pepton-Gelatinen var lavet efter Kochs Forskrift (10 % Gelatine). Den anvendte Dobbeltøl-Agar-Agar bestod af Dobbeltøl med 2 % Agar-Agar.

---

## Hinderne og deres Celler ved 34° C.

Udsaar man i de beskrevne Kolber med Dobbeltøl en ung, kraftig Vegetation af de tre Arter og stiller Kulturerne ved 34° C., saa vil der i Løbet af 1 Døgn udvikle sig fuldstændigt dækkende Hinder. Disse have et saa forskjelligt Udseende, at man, naar man har bemærket dette, altid med Sikkerhed kan skjelne den ene Art fra den anden. Hinden af Bact. aceti er slimet, glat og har Tilbøjelighed til at blive svagt marmoreret, hvorimod Hinden af Bact. Pasteurianum har en tør Overflade og hurtigt bliver rynket og foldet; den hæver sig ogsaa lidt højere over Vædskens Overflade, end den foregaaende. Bact. Kützingianum slutter sig nærmest til Bact. Pasteurianum, men dens Hinde voxer højt op over Vædsken, opad Kolbens Væg. I alle Tilfælde er Øllet fuldstændigt klart, efterat Hinderne ere dannede ved den nævnte høje Varmegrad; men stilles Kolberne derpaa hen ved almindelig Stuevarme, saa bliver det Øl, der er dækket med Bact. Kützingianum, hurtigt uklart, medens de to andre Arters Øl derimod ikke undergaar en saadan Forandring. Efter længere Tids Henstand danner der sig et Bundfald i Kolben med Bact. Kützingianum, og Øllet bliver derpaa atter klart; Væxten er da rimeligvis standset.

Med Hensyn til Overflade-Væxten paa Vædsker, danne Eddikesyrebakterierne en biologisk Række med alle Grader. Bact. Kützingianum dækker ikke blot Overfladen, men voxer højt op over denne; Bact. Pasteurianum er vel en udpræget Luftform, men fjærner sig dog kun lidt fra Vædsken, og Bact. aceti gjør det i endnu mindre Grad; dens Hinde synker tvertimod temmelig let ned i Vædsken. Endnu videre i den sidstnævnte Retning gaa nogle andre Arter; hertil hører f. Ex. en af Zeidlers foran nævnte og navnlig nogle Arter, som fandtes paa de Spaaner, der anvendes i Snareddikefabrikationen; disse dannede nemlig kun med stor Vanskelighed Hinder, som tilmed kun delvis dækkede Øllets Overflade. At dette staar i Forbindelse med de særegne Livsvilkaar, hvorunder disse Arter gjennem endeløse Generationer ere blevne dyrkede i den nævnte Fabrikation, er højst rimeligt. Eddikesyrebakterierne vise os i deres Forhold til Hindedannelsen kort sagt lignende Overgange som de højere Planter, der findes i vore ferske Vande. En kraftig Udsæd af Bact. aceti, Bact. Pasteurianum og Bact. Kützingianum udvikler ogsaa Hinder paa andre Ølsorter end den nævnte, ligeledes paa Urt og fortyndet Vin.

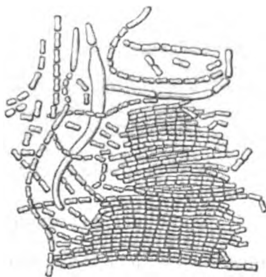


Fig. 2. *Bacterium aceti.*

Vegetation fra en ung Hindedannelse paa Dobbeltøl ved 34° C. Forstørrelsen 1000 Gange lineær.

Underkaste vi de nydannede Hinder fra Kulturer paa Dobbeltøl ved 34° C. en mikroskopisk Undersøgelse, saa finde vi, at Vegetationerne af de tre Arter frembyde et noget forskjelligt Billede. Hos Bact. aceti (Fig. 2) optræde de fleste Celler som smaa, timeglasformede Stavbakterier, kun undtagelsesvis findes længere Stave og Traade med eller uden Opsvulmning; de smaa Stave ere i Reglen ordnede i Kjæder, der kunne have en meget stor Længde.

Bact. Pasteurianum (Fig. 3) adskiller sig fra den foregaaende derved, at Cellerne i de fleste Tilfælde ere større, navnlig tykkere; ogsaa hos denne Art er Kjædeformen den hyppigste.

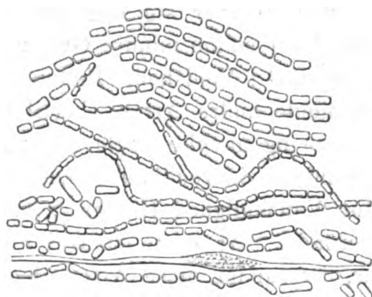


Fig. 3 *Bacterium Pasteurianum.*

Vegetation fra en ung Hindedannelse paa Dobbeltøl ved 34° C. Forstørrelsen 1000 Gange lineær.

Hos Bact. Kützingianum hører det derimod til Sjeldenhederne, at de smaa Stavbakterier ere forenede til Kjæder, hyppigst ere de frie eller to og to forbundne.



Fig. 4. *Bacterium Kützingianum.*

Vegetation fra en ung Hindedannelse paa Dobbeltøl ved 34° C. Forstørrelsen 1000 Gange lineær.

Et Blik paa Fig. 2, 3 og 4 viser Forskjellighederne mellem de tre Arter. De mikroskopiske Billeder af unge Hinder paa Lagerøl og paa Urt vare som de foran beskrevne; dette gjaldt ogsaa, naar Dyrkningen blev foretagen ved 25° istedetfor 34° C. Fig. 2, 3 og 4 vise os kort sagt Cellerne af de tre Arter, naar de dyrkes i gunstige Næringsvædsker og ved gunstige Temperaturer.

**Slimdannelsen.**

De beskrevne Hinder høre til de Væxtformer, som man i Bakteriologien kalder Zoogloeadannelser, idet Cellerne nemlig ere indhyllede i Slim; man kan ikke ved en almindelig mikroskopisk Undersøgelse se denne, men kun slutte sig til, at den maa være der, da Kjædernes Led ogsaa hænge sammen, selv om man ved Tilsætning af Vand og ved Tryk fremkalder en Bevægelse i Præparatet. Det var paa Grund af saadanne Iagttagelser, at allerede Pasteur udtalte den Formodning, at der maatte være en Slimindhylning tilstede. Ved at anvende en passende Behandling, f. Ex. efter Loefflers Methode, træder den imidlertid tydelig frem (Fig. 5).

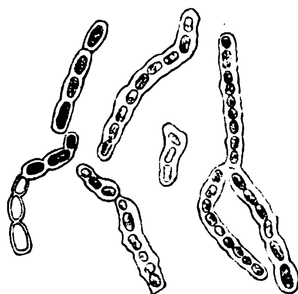


Fig. 5. *Bact. Pasteurianum.*
Slimdannelsen hos en gammel Vegetation paa Øl. Cellerne beitsede og farvede efter Loefflers Methode. Forstørrelsen 1000 Gange lineær.

Og naar man udøver et Tryk paa et saadant Præparat, ser man desuden ret hyppigt, at Cellerne falde ud af Slimlaget, hvorved der da opstaar et gelatinøst Netværk, væsentligt af samme Art, som det jeg for nogle Aar siden har paavist hos Saccharomyceter og andre Gjærceller (se Fig. 5 den nederste Kjæde tilvenstre).

Sætter man Jod-Jodkalium eller Jod opløst i Vand eller i Spiritus til mikroskopiske Præparater med Dele af Hinder, saa viser det sig, som jeg allerede i min ovennævnte Afhandling fra 1879 har fremhævet, at Arterne reagere forskjelligt. Slimen hos Bact. aceti farves ikke, men hos Bact. Pasteurianum og Bact. Kützingianum antager den en blaa Farve. Den sidstnævnte Reaktion træder især tydeligt frem, naar man ved et Tryk paa Dækglasset presser den mellem Cellerne værende Slim ud til Siderne. Herved opstaar der større og mindre blaatfarvede Pletter, medens de der omkring lejrede Celler enten slet ikke

farves eller faa en gul Farve. Under de nævnte Omstændigheder give Præparater med Bact. aceti altsaa kun en gul Farve, hvorimod Præparater af de to andre Arter ikke blot vise denne Reaktion, men tillige, og i endnu højere Grad, den blaa. Foretager man i Løbet af nogle Dage en stærk Udvadskning af Hinderne af Bact. Pasteurianum og Bact. Kützingianum, saa opløses Slimen mere eller mindre, Kjædernes Led skilles ad, og Vegetationens Dele samle sig paa vedkommende Kolbes Bund. Man kan drive denne Udvadskning saa vidt, at den blaa Reaktion ikke længere indtræder. Slimen opfatter jeg som en umiddelbar Fortsættelse af den egentlige Cellevæg. Hvorledes Væggen selv reagerer, har jeg paa Grund af Gjenstandens ringe Størrelse ikke kunnet afgjøre. I de store, opsvulmede Celler ser man tydeligt hos alle Arterne, at Indholdet farves gult. De smaa Celler vise i Reglen kun en meget svag gul Farve og undertiden slet ingen.

Det er endnu kun faa Bakterie-Arter, hvorom det vides, at de kunne give blaa Reaktion med Jod, og iblandt disse ere de to af mig beskrevne de eneste, hos hvilke det er Slimlaget, som reagerer paa denne Maade; hos de andre er det, saavidt man kan se af Beskrivelserne, Celle-Indholdet.

Det er ikke med alle Jodforbindelser, at Slimen hos Bact. Pasteurianum og Bact. Kützingianum giver den karakteristiske blaa Reaktion; med Klorzink-Jod indtræder den saaledes ikke. Dette Reagens bevirker derimod, at Slimen opløses, saa at Kjædernes Led skilles ad. Ifølge Zopfs og Liesenbergs Undersøgelser har Klorzink-Jod en lignende Indvirkning paa Slimhinderne hos Leuconostoc. Cellulosereaktionen indtraadte overhovedet ikke hos Bact. aceti, Bact. Pasteurianum og Bact. Kützingianum, ej heller efter Behandling med Svovlsyre og Jod. Deres Zoogloeadannelse er altsaa ogsaa i kemisk Henseende tydeligt forskjellig fra Zoogloeadannelsen hos den i den forangaaende historiske Indledning omtalte nye Art af Brown, Bact. xylinum. Hos denne er den tilmed, som det erindres, sejg og bruskagtig, og i denne Tilstand kan den opfylde hele Næringsvædsken, hvori den findes; dette er derimod aldrig Tilfældet med Zoogloeadannelsen hos Bact. aceti, Bact. Pasteurianum og Bact. Kützingianum. Hos disse tre Arter optraadte den nemlig kun som en Hindedannelse, ligemeget hvorledes jeg varierede Dyrkningsforholdene. Brown har med Hensyn til Bact. aceti gjort den samme Iagttagelse.

De unge, kraftige Hinder af Bact. Pasteurianum og Bact. Kützingianum, som udvikle sig paa Øl eller paa Urt ved en

gunstig Temperatur, gave bestandig den blaa Reaktion. Foretages denne Dyrkning derimod ved en Varmegrad omkring 41° C., saa bliver Hindedannelsen kun svag, og den giver i Reglen ikke længere den nævnte Reaktion. Ligemeget om de to Arter have udviklet sig paa Overfladen af en Vædske eller paa et fast Substrat, indtræder der et Tidspunkt, hvor de ikke længere formaa at give den blaa Reaktion; saavidt man kan se, bliver Slimen i dette Tilfælde slet ikke farvet af vedkommende Jodopløsning. I nogle Øl-Kulturer fandt jeg, at dette Punkt var naaet efter 3—4 Maaneders Henstand ved almindelig Stuevarme, i andre var dette derimod endnu ikke Tilfældet efter 7—9 Maaneder; der viste sig altsaa en kjendelig Uregelmæssighed i den Henseende. Alle Hinderne i disse Kulturer indeholdt dog levende Celler, og Udsæd deraf dannede bestandig nye Vegetationer, som reagerede paa den normale Maade.

Naar efter lang Tids Henstand alt Liv er udslukket i Hinderne, foregaar der saadanne kemiske Forandringer i Slimen, at den nu ikke giver den blaa Reaktion. Denne Iagttagelse berettiger os naturligvis ikke til omvendt at gjøre den Slutning, at de Celler ville være døde, hvis Slimlag ikke farves blaat af Jod. Med Hensyn til de foran omtalte Hinder, som havde mistet Evnen til at reagere paa den nævnte Maade, men som dog vare levende, kan der tænkes to Muligheder: enten er den berørte Omdannelse foregaaet i Slimen, uden at de tilhørende Celler derfor ere døde, eller, hvis dette sidste er Tilfældet, findes der, omend i en saa overordentlig ringe Mængde, at de ikke opdages, nogle Celler, hvis Slimlag fremdeles reagerer paa den sædvanlige Maade, og det er da disse faa Celler, som fortsætte Livet. Endelig kunne vi ogsaa tænke os begge Muligheder forenede. I alle de beskrevne Tilfælde er der kun Tale om rent foreløbige Omdannelser. Om Slimdannelsen hos Bact. aceti kan paa dette Sted endelig bemærkes, at den bestandig ingen Farvereaktion gav med Jod eller Jod-Jodkalium, ligemeget hvilke Forandringer, jeg foretog i Næringssubstratet og Dyrkningsmaaden.

Alt hvad der hæmmer Udviklingen i kjendelig Grad bevirker efterhaanden, at Slimen hos Bact. Pasteurianum og Bact. Kützingianum ikke længere viser nogen Reaktion overfor Jod. Til de uheldige Næringsvædsker hører Gjærvand; i dette udvikle de to Arter, selv om Temperaturen er gunstig, kun en meget sparsom Vegetation, der kun giver et Tilløb til Hindedannelse, og denne Vegetation viser, i Overensstemmelse hermed, ej heller den blaa Reaktion. Sætter man derimod 1—1½ Vol. % Alkohol eller c. 10 % Dextrose til Gjærvandet, saa danne begge Arterne i

Løbet af faa Dage tydelige Hinder, som reagere med blaa Farve. Skjøndt Udviklingen paa disse Vædsker er temmelig kraftig, staar den dog i kjendelig Grad tilbage for den, der finder Sted, naar Næringsvædsken er Øl. Bact. Pasteurianum gav den kraftigste Hindedannelse; dette gjaldt navnlig om Dyrkning i Blandinger med Alkohol. Med denne Art foretog jeg ogsaa et Forsøg i en Blanding af Gjærvand med 5 % Saccharose. Ligesom i de foregaaende Tilfælde udvikledes der nu Hinder, som gave den blaa Reaktion.

Der haves heri et lille Vink om, hvilke Betingelser, der kræves, for at det Stof i Slimen skal kunne dannes, hvoraf denne Reaktion er afhængig. Om dette Stofs kemiske Sammensætning vide vi for Øjeblikket Intet. Dette gjælder forøvrigt ligeledes om de andre amyloide Stoffer, som omtales i Bakteriologien og Mykologien. Det glæder mig at kunne meddele, at min Kollega, Prof. Kjeldahl, har begyndt paa en kemisk Analyse deraf.

---

### Vegetationerne paa Næringsgelatine.

I et af de foregaaende Afsnit saa vi, at de tre Arter, hvormed vi her særligt beskjæftige os, paa de samme Næringsvædsker dannede Hinder, som havde et forskjelligt Udseende, og at disse Hinders Celle-Indhold ligeledes var forskjelligt; vi bleve herved i Stand til at adskille den ene Art fra den anden. Karakterer af en lignende Værdi iagttage vi ogsaa, naar vi foretage Dyrkningen paa et fast Næringssubstrat. Jeg anvendte hertil de ovenfor nævnte Gelatiner: Urt-Gelatine, Dobbeltøl-Gelatine, Kjødvands-Pepton-Gelatine og Agar-Urt-Gelatine.

Først blev der foretaget en Række Pladekulturer, i hvilke Gelatinen i temmelig tynde Lag blev heldt ud i Petris Dobbeltskaale; efterat den var stivnet ved almindelig Stuevarme, bleve Skaalene stillede ind i en Thermostat ved 25° C. Udsæden var en ung, kraftig Vegetation fra 1 Døgns Kultur paa Dobbeltøl ved 34° C. De i Gelatinen indblandede Celler vare ikke tilstede i større Mængde, end at Kolonierne, som udviklede sig af dem, havde god Plads til deres Væxt. Denne Dyrkning blev foretagen i Urt- og i Kjødvands-Pepton-Gelatine. Nedenfor meddeles først det Resultat, som Urt-Gelatinen bragte.

Bact. aceti dannede i denne Gelatine efter 4 Døgn runde, i Reglen helrandede og hvælvede Kolonier, hvoraf de største havde en Diameter af 1 Millim., efter 9 Døgn af 3 Millim. Navnlig paa

de Steder, hvor Gelatinen dannede et tyndt Lag, fandtes enkelte Kolonier, som vare stjærneformede. Efter lang Henstand var der mange Kolonier, hvis Rande vare bølgede; deres Overflade var i alle Tilfælde jævn. Ved gjennemfaldende Lys havde de et blaaligt Skjær, ved paafaldende Lys vare de graa, voxagtige. De bestode hovedsageligt af frie, smaa Stave; herimellem fandtes dog ogsaa meget talrige længere Stave, som ofte vare tenformigt opsvulmede og krummede, Kjædeformen var aldeles tilbagetrængt, altsaa en Vegetation, som var forskjellig fra den, der dannedes i de foran beskrevne Hinder ved 34° C., og som er afbildet i Fig. 2.

Kolonierne af Bact. Pasteurianum lignede de foregaaende, men havde en svagere Udvikling: efter 9 Døgn var Diameteren af de største kun 2 Millim. Som man kunde vente, gave de den blaa Reaktion. Typiske Kjæder vare her fremtrædende, og derved adskilte denne Art sig tydeligt saavel fra den foregaaende, som fra den efterfølgende; ved Siden af Kjæderne fandtes dog ogsaa temmeligt talrige Celler af samme Slags som hos Bact. aceti.

Bact. Kützingianum dannede lignende Kolonier som Bact. Pasteurianum, og de gave ligeledes den blaa Reaktion. Cellerne stemmede nærmest overens med Bact. aceti, men adskilte sig dog temmeligt tydeligt fra denne derved, at de frie, smaa Stavbakterier vare tilstede i endnu større Overvægt end hos denne Art.

Kolonierne i Spredekulturer i Kjødvands-Pepton-Gelatine havde væsentligt samme Udseende som i Urt-Gelatinen, men de vare gjennemgaaende lidt mindre. Bact. aceti havde ogsaa i dette Substrat den kraftigste Udvikling; Bact. Pasteurianum og Bact. Kützingianum gave den blaa Reaktion. Kolonierne paa Kjødvands-Pepton-Gelatine udmærkede sig derved, at de vare omgivne af mælkeagtige Zoner. Hver Zone var adskilt fra sin Koloni ved et ringformigt, klart Bælte. Zonernes Overflade blev temmeligt hurtigt iriserende, hos Bact. aceti 4 Døgn efterat Udsæden havde fundet Sted, hos Bact. Pasteurianum efter 9—10 og hos Bact. Kützingianum efter 4—5 Døgns Forløb. For det blotte Øje viste de tre Arters Kolonier paa Kjødvands-Pepton-Gelatine næppe kjendelige Differenser, og dette gjaldt ogsaa om Cellerne deri, naar de bleve undersøgte med Mikroskopet. Hos Bact. aceti stemmede de overens med det foran beskrevne Celle-Indhold af denne Arts Kolonier paa Urt-Gelatine; Bact. Pasteurianum sluttede sig nøje hertil; hos Bact. Kützingianum var

derimod det mikroskopiske Billede temmeligt forskjelligt fra de to foregaaende Arters, idet denne Art næsten kun havde dannet frie, smaa Stavbakterier og kun yderst faa længere Stave.

Naar Kulturerne ere gamle, kunne de mælkeagtige Zoner flyde sammen og danne Flammefigurer; dette finder navnlig Sted i de Plader, som have modtaget en rig Udsæd, og hvor der derfor udvikler sig talrige, tæt stillede Kolonier.

Koloniernes Udseende gav os altsaa kun svage Holdepunkter til at skjelne mellem Arterne, og dette gjælder saavel Forsøgene med Urt-Gelatine, som med Kjødvands-Pepton-Gelatine. Større Betydning i den Retning havde den miskroskopiske Undersøgelse af Vegetationerne selv, navnlig af Urt-Gelatinens. De vigtigste Karakterer, hvorved de tre Arter skjelnes fra hverandre, ere saavel her som i det Følgende satte med spærret Skrift. Efter over en Maaneds Henstand fandtes endnu hverken i Urt- eller i Kjødvands-Pepton-Gelatine noget Tegn til, at Vegetationerne kunde gjøre Gelatinen flydende. De længere Stave, der udvikledes, vare som de foregaaende Beskrivelser vise, hyppigt opsvulmede, men der var Intet, som kunde tyde paa, at de vare sygelige Dannelser.

I de foregaaende Forsøg bleve Cellerne indblandede i den flydende Gelatine og ved Omrystning fordelte deri. Efterat Gelatinen er stivnet, ere de altsaa fuldstændigt omgivne af en temmelig fast Masse. Under disse Omstændigheder foregaar Udviklingen med Vanskelighed; først naar Kolonierne have gjennembrudt Gelatinens Overflade, faa Cellerne bedre Vilkaar. En kraftigere Væxt erholdes derimod, naar Udsæden anbringes paa Overfladen af den faste Gelatine. Allerede heri ligger der en Opfordring til ogsaa at anstille Forsøg paa denne Maade, og theoretiske Grunde tale ligeledes herfor. I Pladekulturerne stammer hver enkelt Koloni enten fra een eneste Celle, eller i hvert Fald fra meget faa Celler,[1]) derfor blive Kolonierne i mange Tilfælde ikke Udtryk for Artens Væxtforhold, men kun for Individets og derved ofte for en Variation af Arten. I den bakteriologiske Literatur foreligger der nu talrige Iagttagelser, som vise, at een og samme Art kan optræde med Kolonier af forskjelligt Udseende, ogsaa naar Dyrkningen foregaar aldeles paa samme Maade og i den samme Næringsgelatine. Antydninger deraf findes, som vi have set, ligeledes hos Eddikesyrebakterierne. For at man skal kunne benytte Kolo-

[1]) Just Chr. Holm, Om Rendyrkningsmethoderne og særlig om Kochs Pladekultur og dens Fejlgrændse. (Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet, III. Bd. 1 Hefte, 1891, p. 1.)

niens Udseende som Artsmærke, kræves altsaa egentlig, at man ved Forsøg har skaffet sig et Overblik over de Skikkelser, hvormed vedkommende Arts Kolonier under de givne Betingelser kunne optræde. Naar vi arbejde med saadanne Substanser som Næringsgelatine, hvis kemiske Sammensætning vi ikke fuldstændigt kunne beherske, ville vi alene af den Grund altid være udsatte for større eller mindre Svingninger. Paa disse tænkes her imidlerlid ikke, men kun paa dem, der skyldes Udsæden selv.

De Kolonier, som have udviklet sig hver af een eneste Celle, ere selvfølgeligt mest udsatte for at blive Udtryk for individuelle Afvigelser; i samme Grad derimod som den Udsæd, hvorfra en Koloni stammer, er rig paa Individer, vil der ogsaa være Udsigt til, at Kolonien vil komme til at indeholde det for Arten Almengyldige, saavel i den ene som i den anden Retning.

Ledet af disse Betragtninger udførte jeg følgende Forsøg. Kolber paa 100 Kub. Centim. bleve $^1/_4$ fyldte med Næringsgelatine og lukkede med en Bomuldsprop. Paa Overfladen af Gelatinen blev der anbragt en Draabe af Udsæden; denne var avlet paa samme Maade som i de foregaaende Forsøg og bestod af de samme Arter. Idet Cellerne toges direkte fra Hinderne ved Hjælp af en Glaspind, fulgte selvfølgelig en ubetydelig Smule af Øllet med. I hver Kolbe blev der kun anbragt een Draabe af Udsæden.

Den første Række af disse Forsøg udførte jeg med Urt-Gelatine og ved almindelig Stuevarme. Efter 14 Døgn var der i Kolberne dannet store runde Pletter med graaladen, voxagtig Overflade. Hos Bact. aceti vare de fladt udbredte, rosetformede og rundtakkede; hos Bact. Pasteurianum svagt hvælvede og helrandede, hos Bact. Kützingianum som hos den sidstnævnte Art.

Da Kolberne havde staaet omtrent 3 Maaneder, vare alle Pletterne fladt udbredte og rundtakkede. Pletterne af Bact. aceti udmærkede sig ved deres stærkt fremtrædende Rosetform og skællede Midtparti. Hos de to andre Arter manglede Rosetformen; Midtpartiet hos Bact. Pasteurianum bestod af Foldninger, hos Bact. Kützingianum derimod af svage Skæl. Paa dette Stadium kunde altsaa de tre Arters Pletter tydeligt skjelnes fra hverandre.

Den anden Række Forsøg blev ligeledes udført med Urt-Gelatine, men ved 25° C. Efter 6—9 Døgn vare Pletterne hos de tre Arter hovedsageligt ens; Bact. aceti adskilte sig dog fra de to andre derved, at nogle af dens Pletter vare stjærneformede,

medens de ellers, saavel hos denne Art som hos de to andre, paa dette Stadium vare helrandede.

Tydelige Differenser mellem de tre Arter viste sig derimod efter 18 Døgn. Alle Pletterne vare da graaladne, voxagtige, svagt glindsende og runde; men hos Bact. aceti vare de fladt udbredte, rundtakkede og rosetformede; hos Bact. Pasteurianum derimod svagt hvælvede, helrandede eller svagt rundtakkede og med Foldninger i Midten eller i en koncentrisk Ring omkring et lille jævnt, glat Midtparti. Pletterne af Bact. Kützingianum lignede vel Pletterne af den foregaaende Art, men adskilte sig dog tydeligt fra disse derved, at Overfladen var jævn, uden Foldninger.

I en tredie Række af disse Forsøg anvendte jeg Dobbeltøl-Gelatine; Temperaturen var her ligeledes 25° C. Alle Arterne dannede efter 2—3 Døgns Forløb store, runde, fladt udbredte Pletter, med graaladent, voxagtigt Udseende og med hele eller svagt bølgede Rande. Hos Bact. aceti og Bact. Pasteurianum vare Pletternes Overflade tør, hos Bact. Kützingianum derimod slimet. Den sidstnævnte Art kunde allerede paa dette Stadium med Sikkerhed skjelnes fra de to andre. Efter 4—5 Døgn bleve ogsaa de to andre Arters Pletter mere eller mindre glindsende.

Naar Kulturerne havde staaet 18—20 Døgn, traadte der nye Skjelnemærker frem. Bact. aceti kjendtes nu ved sine rundtakkede, rosetformede Pletter; hos Bact. Pasteurianum vare de helrandede eller svagt rundtakkede, i Midten med Foldninger, der lignede en Hjærnes Overflade; hos Bact. Kützingianum vare Randene ogsaa hele eller svagt rundtakkede, men Overfladen jævn, uden Foldninger.

Ogsaa paa dette Udviklingstrin fandtes altsaa gode Skjelnemærker mellem de tre Arter. Efter en Maaneds Henstand begyndte de iøjnefaldende Differenser, som tidligere iagttoges, at udviskes; der fandt en uafbrudt Skiften Sted.

De saaledes skildrede Forsøg, i hvilke Udsæden blev anbragt paa Overfladen af den faste Gelatine, og i hvilke den til hver enkelt Koloni bestod af et meget stort Antal Individer, gave altsaa gode, for det blotte Øje synlige Kjendetegn for de tre Arter; dette var derimod, som vi foran have set, ikke Tilfældet med Pladekulturerne. I Forsøget med den rige Udsæd udmærkede Bact. aceti sig navnlig ved Pletternes Rosetform og Bact. Pasteurianum sig ved deres Foldninger. De Pletter, som Bact. Kützingianum dannede, fik hverken

Rosetform eller Foldninger. Disse Hovedkarakterer gjentoge sig saavel paa Urt- som paa Dobbeltøl-Gelatinen.

I Beskrivelser af Bakterie-Arterne spille de Væxtbilleder en stor Rolle, som fremkomme, naar Udsæden anbringes i Podestriber i de øvre Lag af Næringsgelatinen eller i Podestik i Dybden. Saadanne Kulturer i Kjødvands-Pepton-Gelatine ved 25° C. af vore tre Eddikesyrebakterier udviklede allerede efter 2 Døgn en kraftig Vegetation, naar Udsæden bestod af unge Celler. Podestriberne viste sig nu som temmeligt brede, svagt hvælvede Baand med bølgede og rundtakkede Rande; Overfladen var mat og rynket. Ved paafaldende Lys vare de graaladne, voxagtige, ved gjennemfaldende Lys havde de et blaaligt Skjær. Efter 3—4 Døgn vare de i Almindelighed omgivne af en mælkeagtig Zone, der var adskilt fra selve Vegetationen ved et smalt, klart Bælte; disse Zoner vare iriserende.

Podestikkene forholdt sig væsentligt paa den samme Maade; kun bredte Vegetationerne sig her ud som en rund Plet omkring Stikket og ikke som et Baand. I Dybden fandt ingen Udvikling Sted. Bact. aceti gav den kraftigste Udvikling. Zonedannelsen kom vistnok senest hos Bact. Pasteurianum; forøvrigt viste de tre Arters Vegetationer de samme Væxtbilleder. Bact. Pasteurianum og Bact. Kützingianum gave som sædvanlig den blaa Reaktion.

Ejheller i Urt-Gelatine og i Agar-Urt-Gelatine gave Kulturer med Podestriber og Podestik Væxtbilleder, som kunde tjene til at skjelne mellem Arterne. Lige saa lidt fremkaldte de tre Arter i Kulturerne med Podestriber og Podestik nogen Opløsning af Gelatinen.

Førend jeg forlader dette Emne, kan jeg bemærke, at jeg i mine foregaaende Beskrivelser navnlig har fremdraget de Karakterer, som i de gjentagne Prøver bestandigt kom igjen, og som jeg derfor har anset for at være typiske for Arten. Der foregaar ved denne Dyrkning som ved al Dyrkning Svingninger, men herved har jeg ikke særligt villet dvæle, for ikke at tabe Hovedmaalet af Syne.

De Karakterer, Kolonierne, Podestriberne og Podestikkene frembyde, ere Vegetationsbilleder, der høre til den samme Kategori, som de Karakterer, vi ovenfor lærte at kjende hos Hinderne. Karakterer af den samme Værdi findes ogsaa hos de højere Planter, men Botanikeren benytter dem ikke i sine Beskrivelser af Arterne; han behøver dem ikke og overlader dem til Maleren. I en vis

Afstand vil en Gruppe af Bøge f. Ex. smælte sammen til en Masse, i hvilken vi ikke længere kunne se de enkelte Træer, men det Hele vil dog faa et særegent Præg, hvorved det adskiller sig fra lignende Grupper af andre Træer. Malerens og Naturvennens Øje skjelner allerede i det Fjærne mellem Skovens forskjellige Træer, men denne Analyse paa lang Afstand har kun lidet at gjøre med botanisk Methode. Bakteriernes Vegetationsbilleder, hvad enten de komme frem ved Dyrkning i Vædsker eller paa fast Bund, høre som sagt til denne Kategori og have ingen anden Betydning end den at yde et praktisk Hjælpemiddel til at kjende Arterne. Om Organismen selv faar man ad den Vej egentlig Intet at vide. Man tør altsaa ikke blive staaende ved denne grove Fremgangsmaade, men maa tage fat paa Cellerne selv og studere Artens Morfologi og Udviklingshistorie. Den Methode, der har Hævd for de højere Planter, og her altid har været fulgt, maa selvfølgelig ogsaa gjælde for de lavere.

I mange Tilfælde har man endnu maattet lade sig nøje med at karakterisere Bakterie-Arterne efter de Billeder, som deres Vegetationer under bestemte Dyrkningsforhold frembyde for det blotte Øje. Det er især Gelatinekulturerne, som i den Retning ere blevne anvendte. Ogsaa maa det erkjendes, at de have faaet en stor Betydning for den praktiske Bestemmelse af Arterne. Paa Grundlag deraf have Koch og flere af hans Elever som bekjendt givet udmærkede Undersøgelser.

I denne Fremgangsmaades Væsen laa imidlertid fra første Stund en Fare for, at det Hele kunde løbe ud i en død Skematiseren, og at Literaturen vilde blive bebyrdet med en haandværksmæssig Masseproduktion; dette er ogsaa blevet Tilfældet. En Syndflod af Artsbeskrivelser ere blevne offentliggjorte, i hvilke der er taget lidet eller slet intet Hensyn til Morfologi og Udviklingshistorie. Undersøgelser i de sidstnævnte Retninger ere vanskelige og kræve megen Tid; efter Gelatinemethoden kan man derimod arbejde hurtigt og efter Recept; det er derfor ikke saa underligt, at der ogsaa i dette Tilfælde kun er Faa, der ville gaa den trange Vej. Jeg har ønsket ved denne Lejlighed at advare mod de Misbrug, der saa hyppigt gjøres af den indenfor sine rette Grændser fortrinlige Gelatinemethode, og at paaminde om ikke at forglemme Cellerne selv.

---

**Begrebet »Arthrospore«.**

Som bekjendt udmærker et stort Antal Bakterier sig derved, at de i deres Indre kunne danne Sporer. Der er imidlertid et mindst ligesaa stort Antal, hos hvilke man hidtil forgjæves har søgt efter disse Formeringsorganer; hertil høre ogsaa Eddikesyrebakterierne. De kunne vel undertiden optræde med stærkt lysbrydende Smaalegemer (se min Fig. 1, p. 275 tilhøjre), men ved et nærmere Eftersyn viser det sig, at disse Legemer ikke ere Endosporer.

For disse og andre lignende Arter opstillede De Bary en ny Afdeling, Arthrobacterium[1]). Han mener, at enkelte af Cellerne uden foregaaende endogen Nydannelse skulde kunne optræde med ægte Sporers Egenskaber og ligesom Endosporerne tjene til at bevare Artens Liv, naar den udsættes for vanskelige Forhold, som Hunger, høj Varmegrad, Udtørring o. s. v. Morfologiske Karakterer, hvorved vi kunne kjende disse »Arthrosporer« fra de vegetative Celler, angives ikke. Hueppe sluttede sig strax i det Væsentlige til De Barys Opfattelse, men var tilbøjelig til at antage, at »Arthrosporerne« ikke kunne optræde i andre Former end som Kokker. Imod Regelen opstilles her et morfologisk Begreb uden morfologiske Karakterer. Almindelig Tilslutning fandt det ej heller hos Bakteriologerne. I Løbet af de ni Aar, der ere hengaaede, siden det blev opstillet, er der vel fremkommet nogle faa Undersøgelser, som gaa ud paa at vise, at visse Arter optræde med »Arthrosporer.« Bevisførelsen blev givet paa fysiologisk Vis, men de Forsøg, som bleve udførte, ere ikke overbevisende. I nogle Tilfælde er det ogsaa senere blevet godtgjort, at Celler, der bleve opstillede som havende Sporers Natur, slet Intet have at gjøre dermed.

Antage vi imidlertid, at de Celler, der bleve bestemte som »Arthrosporer«, ogsaa have en større Modstandsdygtighed end de øvrige, saa staa vi, ret beset, alligevel kun overfor en Gradsforskjel. Arternes rent vegetative Celler ere nemlig efter Alder og Ernæringsforhold mere eller mindre modstandsdygtige. Man vil som Regel i den Henseende finde en hel Skala, hvis Endepunkter kunne være vidt fjærnede fra hinanden. Ogsaa naar vi anstille Forsøg med samme Arts Endosporer, viser det sig, at der er Forskjel paa dem, idet nogle holde længere ud end andre. Konse-

---

[1]) De Bary, Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Leipzig, 1884, p. 506.

kvensen af Læren om »Arthrosporer« er egentlig den, at man kun skulde tillægge de Celler Sporenavnet, som holde længst ud; men hvor er da Grændsen?

Hovedresultatet af disse Undersøgelser bliver den Erkjendelse, at den vegetative Celle kan fungere som Spore, uden derfor at være, hvad vi, morfologisk taget, kalde en Spore. At Elementarstrukturen under disse Omstændigheder paavirkes, følger af sig selv, men herfor mangle vi endnu ethvertsomhelst Udtryk. Begrebet »Arthrospore« er idetmindste for Øjeblikket meget uklart.

Forinden jeg gaar over til det næste Afsnit, kan jeg endelig bemærke, at hverken jeg selv eller nogen af de Forskere, som have undersøgt Eddikesyrebakterierne, fandt Celler, der kunde opfattes som særlige Formeringslegemer.

---

**Morfologiske Omdannelser.**

Betragte vi de mange Skikkelser, hvormed Eddikesyrebakterierne kunne optræde (se Fig. 1, p. 275), saa se vi, at de samle sig om tre Hovedformer: Kjæderne med de korte Stavbakterier, de lange Traade og de opsvulmede Former.

De Undersøgelser, som omtales i det Følgende, have den Opgave at udfinde, hvilke de Faktorer ere, som fremkalde Udviklingen af disse Former, og endvidere at paavise, hvorledes den ene udvikler sig af den anden.

I mine »Undersøgelser over Alkoholgjærsvampenes Fysiologi og Morfologi« har jeg paa flere Steder fremdraget Exempler paa Temperaturens formdannende Evne (Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet, II Bd. 1883, p. 79 og 1886, p. 179). Disse Resultater fra et helt andet Omraade bleve Udgangspunktet for mine Experimenter med Eddikesyrebakterierne.

Naar Dyrkningen blev foretaget paa Dobbeltøl, laa Temperatur-Minimum for Udviklingen af Bact. aceti ved 4—5°, for Bact. Pasteurianum ved 5—6° og for Bact. Kützingianum ved 6—7° C; alle tre Arter havde Temperatur-Maximum omkring 42° og Temperatur-Optimum omkring 34° C.

I disse Dyrkninger viste det sig, at Bact. Pasteurianum udviklede Kjædeformen ved alle Temperaturer mellem Minimum til lidt over Optimum. Ved Varmegrader under 15° C. havde Kjæderners Led ofte en usædvanlig Størrelse, navnlig Tykkelse, og indeholdt stærkt udprægede Vakuoler, saa at Væggen traadte tydeligt

frem. Nær Minimum var det tillige almindeligt at finde korte Celler, som paa den mest uregelmæssige Maade vare blevne opsvulmede. Ved Temperaturer omkring Optimum viste Kjædeformen sig navnlig i sin kraftigste Udvikling og i sin typiske Skikkelse. Leddene vare her udfyldte med en tæt, lidt glindsende Plasmamasse; de vare gjennemgaaende mindre end ved de lave Varmegrader og havde den regelmæssige Form (se Fig. 6). Dyrkning ved denne Temperatur giver os bestandigt en smuk Udvikling af Kjædeformen og ikke blot paa Dobbeltøl, men ogsaa paa Lagerøl; denne Form viser sig overhovedet at være den typiske under de Omstændigheder, hvor Hindedannelsen foregaar med Kraft.

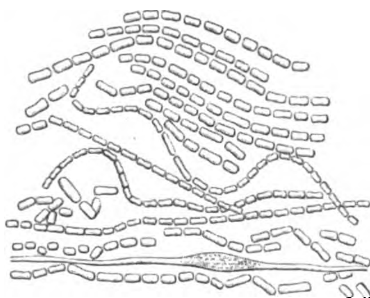


Fig. 6. *Bacterium Pasteurianum.*

Vegetation fra en ung Hindedannelse paa Dobbeltøl ved 34° C. Forstørrelsen 1000 Gange lineær.

I et af de foregaaende Afsnit have vi hørt, at der paa Dobbeltøl ved 34° C. udvikler sig en fuldstændigt dækkende Hinde i Løbet af et Døgn, naar Udsæden bestaar af unge, kraftige Celler. Overføre vi et Spor af en saadan Vegetation i en Kolbe med Dobbeltøl og stiller den derpaa hen ved 40—40½° C., saa vil der her efterhaanden foregaa en hel Omdannelse af Cellerne. Allerede efter 2 Timer kunne vi iagttage, at en kjendelig Strækning af Kjædernes Led er begyndt (Fig. 7. I). Denne tager efterhaanden til (II og III), men paa en uregelmæssig Maade, idet nogle Led ere længere end andre. Efter 8—9 Timer findes dels Kjæder med meget lange Led, dels frie Bacilformer (IV). Paa dette Stadium skilles Leddene let ad; fire Timer senere er det kun undtagelsesvis, at vi træffe Kjæder, og disses Led have nu opnaaet en overordentlig Længde, 40 $\mu$ og derover (V).

Hvis vi lade Kulturen staa i Ro 24 Timer ved den nævnte høje Temperatur, saa vil en meget svag Hindedannelse finde Sted,

og vi ville da have en Vegetation som i Fig. 8, nemlig af den typiske Traadform. Vidste vi ikke, at den havde udviklet sig af Kjædeformen, vilde vi antage, at den hørte til en helt anden Art,

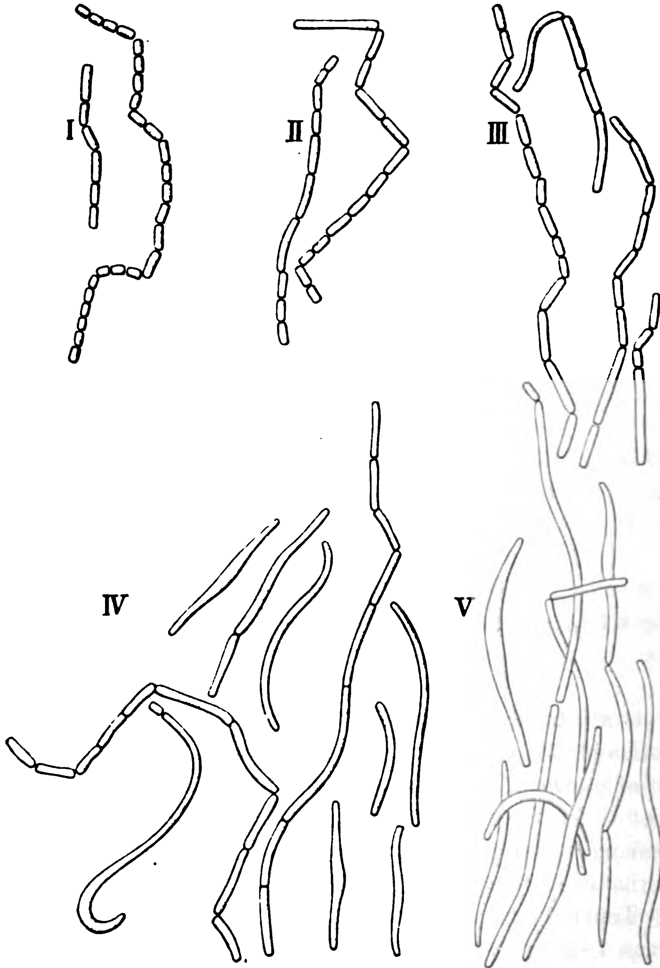



Fig. 7. *Bacterium Pasteurianum.*

Traadformens Udvikling ved Dyrkning i Dobbeltøl ved c. 40½ C. I viser Udviklingen efter 2, II efter 4, III efter 6, IV efter 8—9, V efter 12 Timer. Tidsangivelsen er regnet fra Forsøgets Begyndelse. Forstørrelsen 1000 Gange lineær.

saa forskjellige ere de to Former fra hinanden. Traadene kunne have en Længde af 200 $\mu$ og derover, medens Kjædernes Led, hvorfra de stamme, kun maale 2—3 $\mu$.

I det foregaaende Forsøg blev Dyrkningen foretaget i fem af de foran beskrevne Freudenreichs Kolber med Dobbeltøl; de bleve ved Forsøgets Begyndelse inficerede paa een Gang og derpaa alle stillede ind i en Thermostat ved den ønskede Temperatur. Paa de angivne Stadier blev efterhaanden en af Kolberne taget ud til

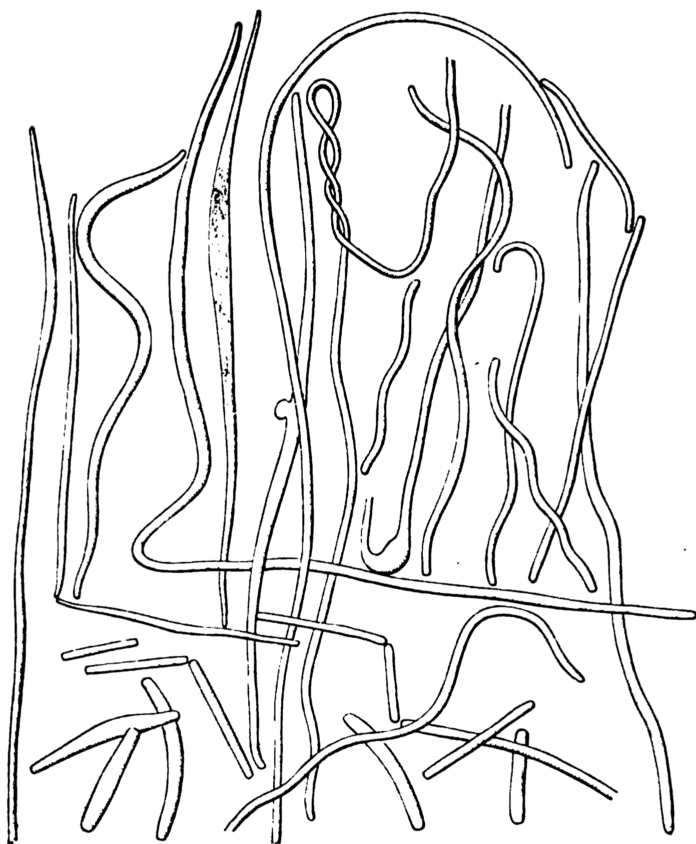


Fig. 8. *Bacterium Pasteurianum.*
Traadformen fra 1 Døgns Kultur i Dobbeltøl ved 40—40½° C. Forstørrelsen 1000 Gange lineær.

Undersøgelse, medens de andre bleve staaende i Ro; de havde altsaa den samme Varmegrad fra det Øjeblik, da Udsæden fandt Sted, til det, da de bleve undersøgte. Paa denne Maade faar man en kraftig Vegetation til Undersøgelse og et Overblik over de Former, der findes paa Udviklingens forskjellige Trin. Ønsker man imidlertid at vide nøjere Besked om, hvorledes de omdannede

Celleformer ere opstaaede, saa er denne Fremgangsmaade ikke tilstrækkelig; man maa da under Mikroskopet Skridt for Skridt følge de enkelte Cellers Udvikling. Hertil anvender man i det foreliggende Tilfælde bedst et stort Kammer af Bøttchers Model og som Næringssubstrat enten Dobbeltøl eller Dobbeltøl-Agar-Agar. Dette anbringes i et tyndt Lag paa Undersiden af Dækglasset, og derpaa indfører man paa Midten deraf nogle faa af de Celler, hvis Udvikling man ønsker at studere. Det Hele maa helst ske paa en saadan Maade, at Renkulturen bevares, og man maa drage Omsorg for, at Næringssubstratet ikke udsættes for Fordampning.

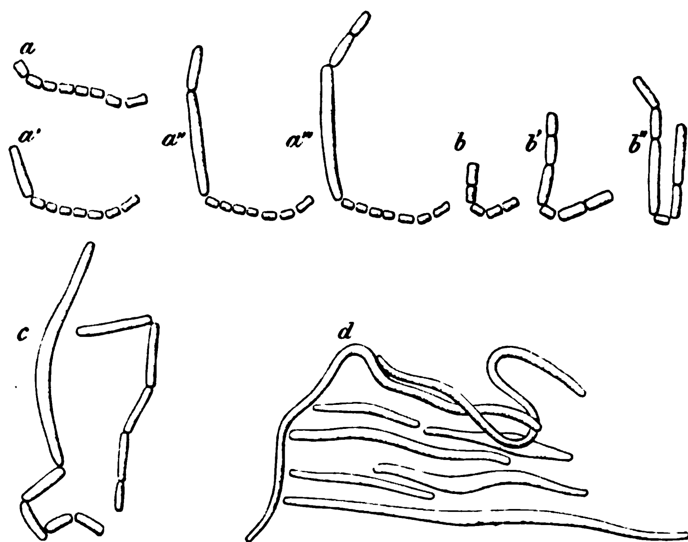



Fig. 9. *Bacterium Pasteurianum.*

Traadformens Udvikling ved Dyrkning paa Dobbeltøl-Agar-Agar i Bøttchers Kammer ved c. $40^1/_2$° C. a en Kjæde bestaaende af 8 Led, a' samme efter 6, a'' efter 10, a''' efter 20 Timer. b en Kjæde bestaaende af 5 Led, b' efter 5, b'' efter 9 Timer. c Udviklingen efter 10, d efter 21 Timer. Tidsangivelsen er regnet fra Forsøgets Begyndelse. Forstørrelsen 1000 Gange lineær.

Udviklingsrækken i ovenstaaende Fig. 9 skyldes en saadan Dyrkning paa Mikroskopbordet ved c. $40^1/_2$° C. I a—a''' er det kun den yderste Celle tilvenstre i Kjæden, som er bleven omdannet, idet den har strakt sig til en betydelig Længde og derpaa delt sig (a', a''). Dattercellen har i a''' taget til i Længde og derefter delt sig; samtidig har den nedenunder værende Modercelle fortsat sin Længdevæxt. De øvrige Celler i Kjæden ere vedblevne at være uforandrede. I den femcellede Kjæde, b, tage derimod de

fire Celler Del i Udviklingen (b—b''). Ved de nævnte høje Varmegrader foregaar der altsaa ikke blot en Omdannelse af de udsaaede Kjæders Led, men tillige en uafbrudt Nydannelse og Formering. Figurgrupperne i c og d vise os Slutningsstadierne af Udviklingen.

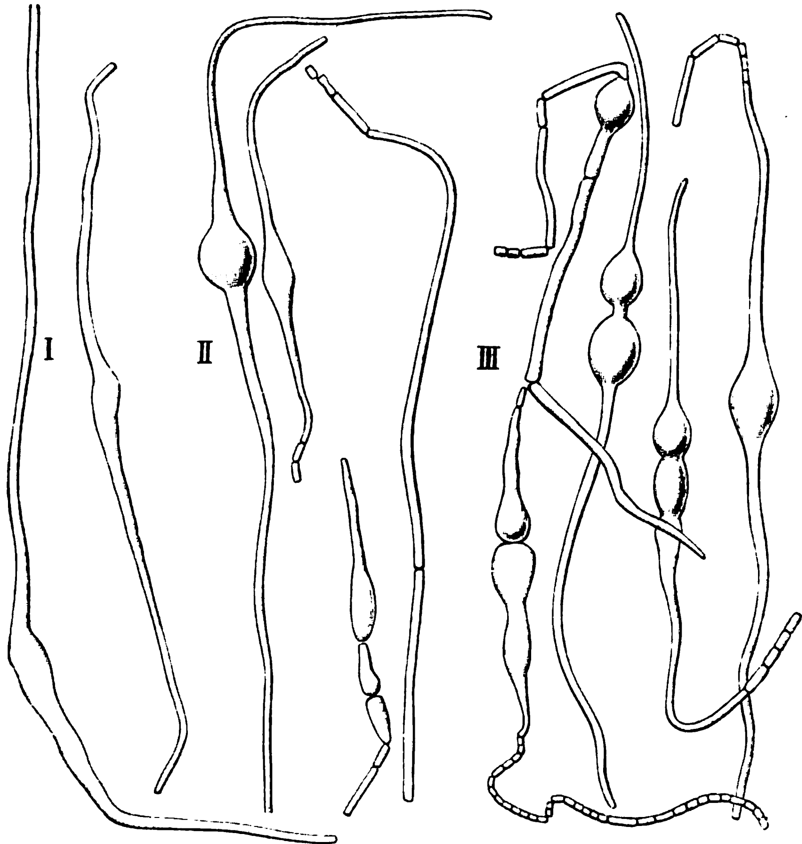



Fig. 10. *Bacterium Pasteurianum.*

Traadformens Omdannelse til de opsvulmede Former og Kjæder ved Dyrkning i Dobbeltøl ved c 34° C. I viser Udviklingen efter 4, II efter 5, III efter 7 Timer. Tidsangivelsen er regnet fra Forsøgets Begyndelse. Forstørrelsen 1000 Gange linear.

Traadene naaede ikke en saa betydelig Længde i Kamrene som i Kolberne, og Væxten foregik overhovedet her med mindre Kraft.

Vi have altsaa set, at der ved 40—40½° C. under de nævnte Omstændigheder udvikles en Vegetation, bestaaende af den typiske Traadform. Hvis vi nu stille de Kolber, hvori denne findes, ind

ved 34° C., saa foregaar der atter en Omdannelse til Kjædeformen. Det Samme er Tilfældet, naar vi overføre Traadformen i nye Kolber med Dobbeltøl. og derpaa udsætte disse for den sidstnævnte Varmegrad. Undersøgelsesmethoden er selvfølgelig den samme, som foran blev omtalt.

Den omstaaende Fig. 10 viser de forskjellige Former, som i Løbet af syv Timer udviklede sig i disse Kulturer. I Forsøgets Begyndelse finde vi kun Traade uden Opsvulmninger, men efter fire Timers Forløb ere disse temmeligt almindelige (I); de tage derpaa til, baade i Antal og i Omfang, og samtidigt dermed se vi, at Delingen begynder (II). Et Par Timer senere har der udviklet sig endnu flere Opsvulmninger, og Delingen er skreden meget videre frem; vi finde nu ofte Traade, som hver have to eller flere stærke Opsvulmninger, og de mest uregelmæssige Skikkelser ere nu almindelige (III).

Forfølge vi i det fugtige Kammer paa Mikroskopbordet Skridt for Skridt den hele Udvikling, som Traadene gjennemgaa ved 34° C., saa se vi, at de før Delingen saavel tage til i Længde som i Tykkelse, og ofte i en meget betydelig Grad. Ved Forøgelsen i Tykkelse blive de mere eller mindre tenformede, i mange Tilfælde svulme de tillige stærkt op paa et eller flere Steder. Fig 11 a, a' viser os en saadan Traad, som ikke blot har forlænget sig i høj Grad og er bleven tenformig fortykket, men tillige har dannet to stærke Opsvulmninger. Først derefter begyndte Delingen (a''). I b—b''' har jeg afbildet den Omdannelse, som den bugtede Traad, b, gjennemgik i Løbet af 9 Timer. Forinden Delingen forøgede Traaden sin Længde omtrent til det Dobbelte (b'); Tilvæxten i Tykkelse var paa de første Stadier (b', b'') vel kjendelig, men dog forholdsvis ringe, senere traadte den stærkt frem (b'''). Denne Udviklingsrække viser os tillige det Forhold, at en Traad, efterat Delingen er i fuld Gang, kan vedblive at voxe saavel i Længde som i Tykkelse (b'', b''').

Delingen kan begynde saavel i Endepartierne som i Midten; hyppigt ere smaa Led adskilte ved meget store; der hersker kort sagt stor Uregelmæssighed i den Henseende. Med Hensyn til Fortykkelsen findes der ogsaa alle Overgange fra den jævnt tenformede til den stærkt fremtrædende pæreformede og ovale. Som Afbildningerne vise, kunne de mest forskjellige Skikkelser fremtræde under denne Udvikling; de maa dog, som sagt, alle betragtes som havende den samme Værdi. Ikke sjeldent fandt jeg kugleformede Opsvulmninger, hvis Diameter var 11 $\mu$. Hele Traaden kan dele sig, og dette er vistnok Regelen.

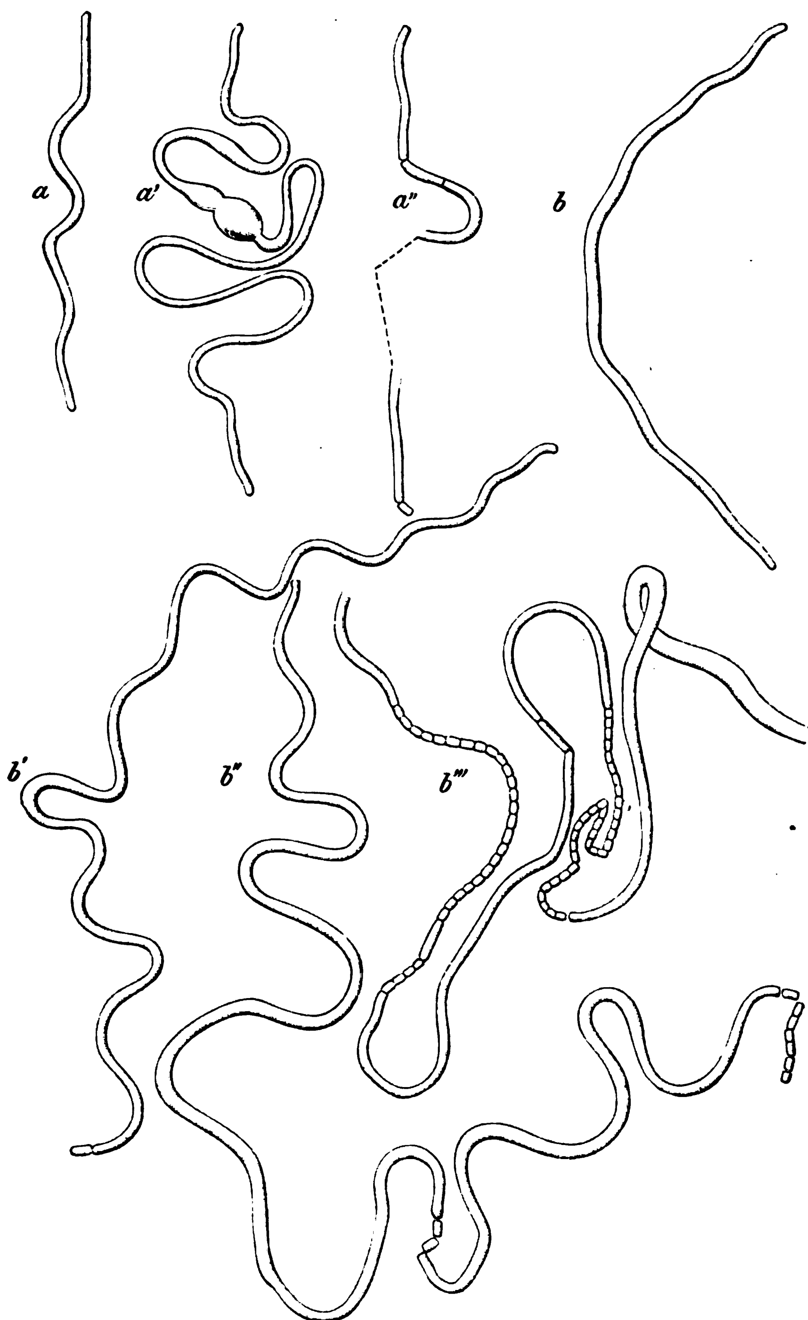



Fig. 11. *Bacterium Pasteurianum.*

(Se Forklaringen næste Side.)

Traådformens Omdannelse til de opsvulmede Former og Kjæder ved Dyrkning paa Dobbeltøl-Agar-Agar i Bøttcher's Kammer ved c. 34° C. a en bugtet Traad, a' samme efter 5½, a'' efter 7 Timer. I den sidstnævnte Afbildning er Midtpartiet med den stærke Opsvulmning udeladt og kun Endepartierne fremstillede. b en krummet og svagt bugtet Traad; b' samme efter 4, b'' efter 6, b''' efter 9 Timer; denne Figur viser kun det midterste Parti af Traaden. Tidsangivelsen er regnet fra Forsøgets Begyndelse. Forstørrelsen 1000 Gange lineær.

Dette gjælder ogsaa om de tykke, opsvulmede Partier; den tykkeste Del heraf deles dog ikke (se Fig. 10 og 12).

Har man fulgt Kulturer som de beskrevne i Dobbeltøl i Løbet af et Par Døgn, saa vil man kunne iagttage, hvorledes flere og flere af de stærke Opsvulmninger opløses. Deres Indhold bliver efterhaanden grynet og træder ud (Fig. 12 c); undertiden ses det,

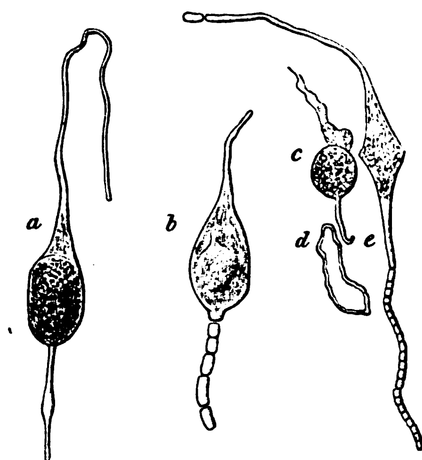



Fig. 12. *Bacterium Pasteurianum.*

Brudstykker af opsvulmede Traade efter 1—2 Døgns Kultur i Dobbeltøl ved 34° C. I a løber den pæreformede Opsvulmning ud i to meget tynde Traade; i b har Delingen naaet dens brede Grundflade; i c er den i Færd med at opløses, idet en Del af Plasmaet træder ud; d viser den tykke Væg af en Opsvulmning, hvis Plasma er udtraadt; e en stærkt tendannet Opsvulmning med to tynde Traade i Deling. Forstørrelsen 1000 Gange lineær.

at Væggen af en saadan udtømt Opsvulmning kan have en anselig Tykkelse (d); ofte er den dog tynd og falder derfor let sammen. Nogle af mine Iagttagelser vise hen til, at de tynde Traade, der udgaa fra Opsvulmningerne, (se a og e), ere Nydannelser, der kunne gjentage sig flere Gange. Hvis denne Formodning bekræfter sig, er dette et nyt Tegn paa, at de opsvulmede Former tjene Formeringen. I Fig. 11, b—b''' har jeg vist ved direkte Iagt-

tagelse, at der under Traadens Deling foregaar en Nydannelse paa de forskjellige Stadier, saavel Længde- som Tykkelsevæxt; dette taler ogsaa for Rigtigheden af den fremsatte Formodning.

Lade vi Kolben med Dobbeltøllet, hvori Traadformen blev udsaaet, staa et Døgn ved 34° C., saa udvikler der sig en kraftig Hindedannelse. bestaaende af de typiske Kjæder med deres Led af korte Stavbakterier. I de fugtige Kamre varer det noget længere, førend denne Omdannelse er naaet saa vidt. Fra Traadformen ere vi saaledes atter vendte tilbage til Kjædeformen, og vi have set, at de opsvulmede og uregelmæssige Former ere et Mellemled i denne Udviklingskreds. De formdannende Faktorer ere under de foreliggende Omstændigheder Temperaturerne 34° og 40—40½° C. Nu, da vi kjende disse, kunne vi efter Forgodtbefindende fremkalde, hvilken af Formerne vi ønske.

Naar vi istedetfor Dobbeltøl og Dobbeltøl-Agar-Agar anvende Urt, saa foregaar Udviklingen ved de nævnte Temperaturer væsentligt paa samme Maade, som ovenfor blev beskrevet, men med mindre Kraft; dette gjælder navnlig, naar Sammenligningen foretages med Dobbeltøllet. Ogsaa med Hensyn til Varmegraden er der et Spillerum. Ved 39° C. begynder Traadformen at træde frem, og ved 40° C. har den Overvægt; dette gjælder saavel om Kulturer i Dobbeltøl som i Urt, men medens der endnu i Nærheden af 42° C. kan finde en kjendelig Udvikling Sted i Dobbeltøllet, standser denne derimod i Urten ved en lidt lavere Varmegrad. Udviklingen af de opsvulmede Former og Traadenes Omdannelse til Kjædeformen foregaar, naar de netop nævnte Næringssubstrater anvendes, ikke blot ved 34° C., men tillige ved almindelig Stuevarme og maaske ved endnu lavere Temperatur; i disse Tilfælde dog langsommere.

De foregaaende Forsøg have vist, at Temperaturen er en formdannende Faktor, dog kun under den Betingelse, at Dyrkningen foregaar paa et gunstigt, extraktrigt Næringssubstrat, som de nævnte. Tage vi istedet derfor f. Ex. almindeligt undergjæret Lagerøl, saa bliver Udviklingen en anden. Det er altsaa den særegne Næringsbund i Forening med Temperaturen, der betinger Resultatet, og vi kunne hertil som en tredie, virksom Faktor føje den Alders-Tilstand, hvori vedkommende Celler ved Forsøgets Begyndelse befinde sig. I de beskrevne Forsøg toges Udgangspunktet fra en ung, kraftig Vegetation, som var avlet paa Dobbeltøl i et Døgns Kultur ved 34° C.; men lade vi den blive blot et Døgn ældre, saa træder Traadformen vanskeligere og langsommere

frem, og naar den har naaet en vis Alder, vil det slet ikke lykkes, selv om Cellerne forøvrigt ere levedygtige. Paa samme Maade vil den morfologiske Omdannelse af Traadformen, som er udviklet under Indvirkning af den høje Temperatur, slet ikke indtræde,

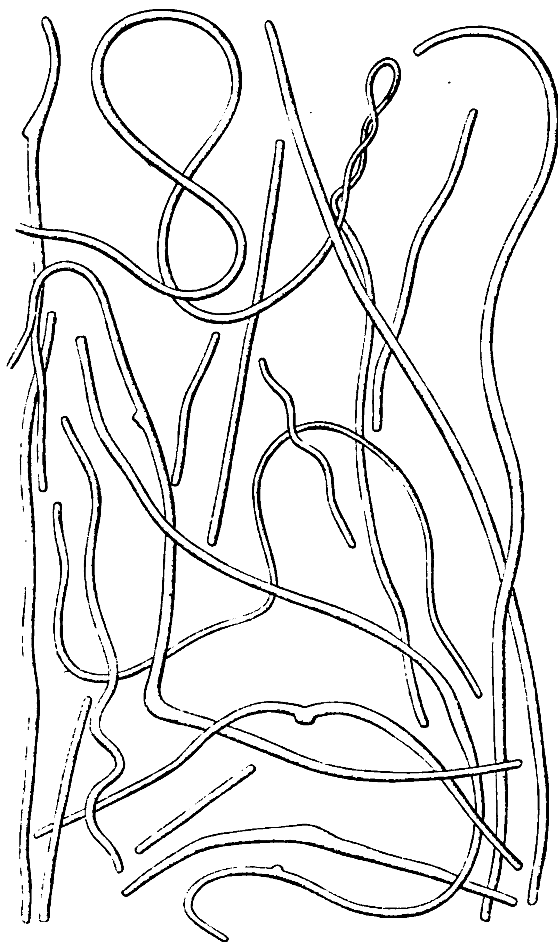


Fig. 13. *Bacterium aceti.*

Traadformen fra 1 Døgns Kultur i Dobbeltøl ved 40—40½° C. Forstørrelsen 1000 Gange lineær. Traadene i denne Afbildning ere i nogle Tilfælde blevne lidt for tykke

hvis vi vente for længe med at overføre den til den gunstige Temperatur. Vi lære heraf, at de ovenfor beskrevne Fænomener kun træde tydeligt frem, naar de Celleformer, hvormed vi udføre Forsøgene, ere unge og kraftige.

De foregaaende Undersøgelser over de morfologiske Omdannelser bleve alle udførte med Bact. Pasteurianum. Under de samme Omstændigheder gjennemgaa Bact. aceti og Bact. Kützingianum imidlertid i alt Væsentligt en lignende Udvikling. Udsaa vi ved 40—40½° C. den typiske Kjædeform af Bact. aceti, som er avlet ved 34° C., saa dannes her paa samme Maade som hos Bact. Pasteurianum Traadformen, og overføres denne derpaa til 34° C., saa omdannes den atter til Kjædeformen, idet Forøgelse i Længde og Tykkelse indtræder og lignende Opsvulmninger fremkomme som hos Bact. Pasteurianum. Cellerne i Kjædevegetationen fra 34° C. ere, som det erindres, tyndere hos Bact. aceti end hos Bact. Pasteurianum (sammenlign Fig. 2, p. 291 og Fig. 3, p. 292); en lignende Forskjel findes der mellem de to Arters Traadform (sammenlign Fig. 13 med Fig. 8, p. 307), den er ikke kommen saa tydelig frem i disse Afbildninger, som den burde. Under Udviklingen til Traadformen skille Kjædernes Led sig ogsaa fra hverandre paa et tidligere Stadium end hos Bact. Pasteurianum. De længste Traade, som jeg iagttog hos nogen Art, fandtes hos Bact. aceti; de maalte indtil 500 $\mu$.

Vegetationerne af Bact. Kützingianum ved 34° C. adskille sig, som det ovenfor blev vist, tydeligt fra de to andre Arters (sammenlign Fig. 4, p. 292 med Fig. 2, p. 291 og Fig. 3, p. 292); men de morfologiske Omdannelser foregaa paa samme Maade som hos disse. Traadformens Vegetation hos Bact. Kützingianum stemmer nærmest overens med den tilsvarende Vegetation hos Bact. Pasteurianum, i Regelen indeholder den dog forholdsvis flere korte Traade.

De i dette Afsnit beskrevne Udviklings-Fænomener har jeg i Hovedtrækkene gjenfundet hos de Eddikesyrebakterier, som i den Henseende bleve underkastede en Prøve; der gjør sig altsaa en vis Lovmæssighed gjældende, som sandsynligvis omspænder en større Gruppe af Arter. Jeg har ligeledes Grund til at formode, at dette ogsaa gjælder om flere andre Bakterer end netop Eddikesyrebakterier.

Foruden de ovennævnte tre Arter, Bact. aceti, Bact. Pasteurianum og Bact. Kützingianum, bleve fire andre undersøgte paa lignende Maade som disse. De gave alle gul Reaktion med Jod-Jodkalium; den ene havde jeg udskilt af eddikesurt overgjæret Øl, den anden var en Art, som Zeidler havde fundet i Lagerøl og godhedsfuldt tilstillet mig; den tredie og fjerde Art endelig bleve her paa Laboratoriet udskilte af Mæsken fra en

Snareddikefabrik paa Amager. De to førstnævnte dannede hurtigt kraftige Hinder paa Dobbeltøl og uden at fremkalde nogen Uklarhed i denne Vædske; de to sidstnævnte gjorde derimod under de samme Omstændigheder kun et svagt Tilløb til Hindedannelse og bevirkede, at Dobbeltøllet blev uklart. Undersøgelsen af disse Arters systematiske Forhold gik ikke videre end til at fastslaa, at de ikke blot vare forskjellige fra de tre foran beskrevne, men tillige indbyrdes forskjellige. Prøverne for de morfologiske Omdannelser bleve efter min Anvisning udførte af Hr. Assistent Klöcker.

Som allerede berørt gjennemgik de under de tilsvarende Dyrkningsforhold i Hovedtrækkene den samme Række af morfologiske Omdannelser som Bact. aceti, Bact. Pasteurianum og Bact. Kützingianum. Den Art, som jeg havde udskilt fra det eddikesure Dobbeltøl, viste en særlig Tilbøjelighed til at udvikle de opsvulmede Former; hos de to Arter fra Snareddikefabrikken var denne Tilbøjelighed derimod kun tilstede i meget ringe Grad, og Traaddannelsen indtraadte hos dem ligeledes kun med ringe Kraft. Den gunstigste Temperatur for Udviklingen af Traadformen var hos disse to Arter 39° C. og for dennes Omdannelse til Kjædeformen 30° C. At Evnen til at udvikle de nævnte Celleformer er i forskjellig Grad tilstede hos Arterne er ikke Andet, end hvad vi forud maatte vente; ogsaa i den Henseende danne de en hel Skala.

I de foregaaende Undersøgelser over Temperaturen som formdannende Faktor saa vi, at Traadformen udviklede sig ved 39—40½° C., og at de opsvulmede Former fremkom, naar Traadene bleve dyrkede ved 30—34° C.

Hvis vi fortsætte Dyrkningen af Bact. aceti, Bact. Pasteurianum og Bact. Kützingianum et Par Døgn ved 40—40½° C., saa ville vi hyppigt kunne iagttage, at Traadene tage til i Længde og i Tykkelse og blive forsynede med de ofte omtalte uregelmæssige Opsvulmninger. Jeg opfatter dette Fænomen som Tegn paa, at vedkommende traadformede Celle forbereder sig paa at dele sig. Traadene udholde nemlig kun en forholdsvis kort Tid Opholdet ved den ugunstige, høje Temperatur, og Artens Liv er altsaa stærkt truet. Under disse Omstændigheder bliver det imidlertid som Regel kun ved Tilløbet. Er vedkommende Vegetation af traadformede Celler kun udsat for en Varmegrad af 39° C., saa udvikle de opsvulmede Former sig ikke blot i stort Antal efter et Par Døgns Henstand, men der indtræder tillige en temmelig kraftig Formering. Disse Iagttagelser vise hen til, at de opsvulmede Former, der dannes ved de høje Tempera-

turer, have samme Betydning som de, der dannes, naar Traadformen fra en høj Temperatur stilles hen ved den lavere, i de foregaaende Tilfælde ved 34° C.

Vanskeligere bliver det at forklare, hvorledes de Traade og opsvulmede Celleformer opstaa, der ikke sjeldent findes som en underordnet Indblanding i Vegetationer, hvis Hovedmasse bestaar af den typiske Kjædeform, og som ere avlede efter Udsæd af

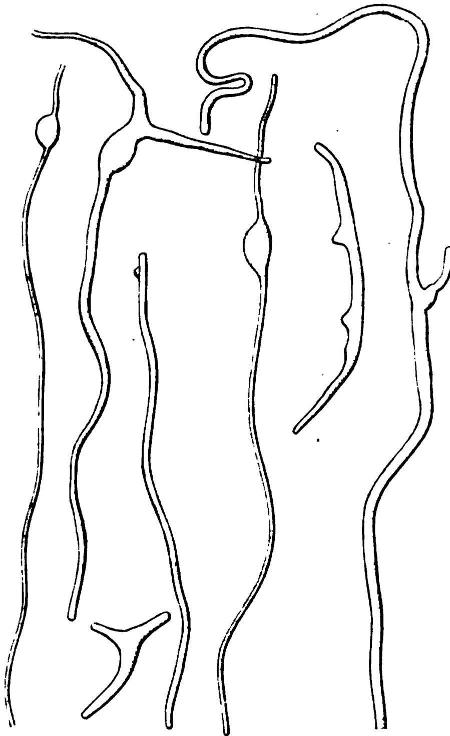


Fig. 14. *Bacterium aceti.*

Usædvanlige Celleformer fra flere Døgns Kultur i Urt og Dobbeltøl ved 39—41° C. Forstørrelsen 1000 Gange lineær.

Kjædeformen ved 34° C. Undertiden, men ikke altid, fremkom de, naar en Vegetation i længere Tid stod hen. Om deres Betydning vide vi Intet; indtil videre maa vi henregne dem til Uregelmæssighederne.

Saadanne opsvulmede Traade som de i mine foran staaende Fig. 10, 11 og 12 afbildede, blive af Nägeli og hans Efterfølgere betragtede som abnorme Former, der

ikke høre ind i den normale Udvikling, men derimod ere Tegn paa, at vedkommende Celle er i Færd med at dø. En nærmere Undersøgelse af hvilken Betydning de have, blev hidtil dog ikke givet. (Se Haandbøgerne af De Bary, Zopf og Andre). Allerede i min foran nævnte Afhandling fra 1879 havde jeg saavel i Texten som i Afbildningerne vist, at de opsvulmede Traade optræde, medens Udviklingen er i kraftig Gang, og at de formere sig ved Deling. Mine foregaaende udviklingshistoriske Undersøgelser vise, at disse tilsyneladende abnorme Skikkelser optræde regelmæssigt og netop betegne, at en kraftig Væxt finder Sted. Forsaavidt har Nägelis Opfattelse altsaa ingen almindelig Gyldighed.

I Begyndelsen af dette Afsnit, hvor Bact. Pasteurianum blev omtalt, have vi hørt, at der ogsaa ved de lave Temperaturer finder en ejendommelig morfologisk Omdannelse Sted; dette gjælder ligeledes om Bact. aceti; Bact. Kützingianum blev ikke undersøgt i den Henseende. Ved 5—6° C. udviklede Bact. aceti saaledes en Rigdom af korte, stærkt opsvulmede Celler, som hyppigt vare pæreformede, men forresten kunde optræde med de mest uregelmæssige Skikkelser.

Hvor stor end den Formrigdom er, hvormed de tre Arter optræde, hvis Morfologi og Udviklingshistorie i det Foregaaende særligt er bleven gjort til Gjenstand for vor Undersøgelse, saa høre grenede Celleformer dog til Sjeldenhederne. I omstaaende Fig. 14 er der afbildet tre saadanne; som en Begyndelse til Forgreninger kan man maaske betragte de Knuder, der findes paa Siderne af de to Traade. De to meget tynde Traade med de tykke pæreformede Opsvulmninger ere ligeledes ejendommelige og derfor tagne med i denne Gruppe af usædvanlige Former.

---

### Om Livsgrændsen.

Det har en almindelig biologisk Interesse at undersøge, hvorlænge en Organisme under bestemte Forhold kan fortsætte sit Liv. For saadanne Mikroorganismer som de, hvormed vi her beskjæftige os, faa disse Undersøgelser endvidere en praktisk Betydning derved, at de lære os, hvorledes vi paa den bedste Maade og i den længste Tid kunne opbevare dem i levende Tilstand; dette er nemlig af Vigtighed for Arbejderne i de bakteriologiske Laboratorier.

I den historiske Indledning berørte jeg, at mine Studier over Eddikesyrebakterierne paa Grund af Omstændighederne kom til at strække sig over en lang Aarrække. Der blev derfor til forskjellig Tid sat større og mindre Rækker af Kulturer i Gang. Naar jeg havde benyttet dem til de Forsøg, hvortil de for Øjeblikket skulde tjene, stillede jeg dem hen for senere at anvende dem til Prøver for Livsgrændsen. Materialet til mine Undersøgelser i denne Retning blev hovedsageligt tilvejebragt paa denne Maade. En særegen Vanskelighed paa dette Omraade er den, at man maa regne med de store Tidsrum; som det Efterfølgende viser, strækker den enkelte Analyse sig i flere Tilfælde over 6 Aar. De Undersøgelser, der hidtil foreligge over Mikroorganismernes Livsgrændse, bestaa derfor ogsaa kun af spredte Analyser og enkeltstaaende Iagttagelser. For Eddikesyrebakteriernes Vedkommende er det første Gang, at der gives et Bidrag i den Henseende.

Fremgangsmaaden var i Korthed følgende: Unge, kraftige Celler bleve dels udsaaede i Dobbeltøl, Lagerøl, Gjærvand, Saccharoseopløsning, Urt-Gelatine og Dobbeltøl-Gelatine, dels bleve de i ringe Mængde anbragte paa et Platintraadøje, som derpaa blev opbevaret i en tom Freudenreich-Kolbe. Paa Ølvædskerne og Urt-Gelatinen dannes, som vi have hørt, en kraftig Vegetation; i Gjærvand derimod kun en svag og i Saccharoseopløsning vistnok en endnu svagere. Alle Kolberne bleve stillede ind i et mørkt Skab ved almindelig Stuevarme. De Celler, som fandtes paa Platintraaden, vare her udsatte for en temmelig langsom Indtørring. Til forskjellig Tid blev der udtaget Prøver, som overførtes i Dobbeltøl og i nogle Tilfælde tillige i Lagerøl ved 34° C. Disse Kulturer bleve staaende 14—16 Døgn, hvis de ikke inden Udløbet af dette Tidsrum havde dannet Hinder, og naar der under de nævnte Omstændigheder ingen Udvikling viste sig, bleve de saaledes prøvede Celler betragtede som døde. Gav den første Prøve intet Livstegn, blev der paa samme Maade taget en anden og tredie Prøve, saaledes at alle Cellerne i vedkommende Kolbe efterhaanden bleve prøvede.

Da det ikke er muligt ved den mikroskopiske Undersøgelse at afgjøre, om en Celle er levende eller ej, have vi ingen anden Vej at gaa, end at anstille et Dyrkningsforsøg. Hertil vælge vi de gunstigste Betingelser, vi kjende; men dette udelukker jo ikke, at der maaske kan findes endnu gunstigere. Vi maa derfor være forberedte paa, at nogle af de Celler, som i vore Kulturer intet Livstegn have givet, dog alligevel kunne have bevaret en Gnist af Liv. Der er, kort sagt, Sandsynlighed for, at vore Resultater

kun ere tilnærmelsesvis rigtige, og vi ere udsatte for at sætte Livsgrændsen lidt for lavt.

Jeg skal derefter gaa over til at meddele Resultatet af disse Undersøgelser.

Bact. aceti holdt sig i Lagerøl levende over $4^1/_2$ Aar, i Gjærvand $1^5/_6$ Aar; efter $2^3/_4$ Aar var den død i denne Vædske; i Saccharose var den levende over $1^1/_4$ Aar, paa Urt-Gelatine og paa Dobbeltøl-Gelatine over 5 Maaneder.

Bact. Pasteurianum var i Dobbeltøl levende over $2^1/_2$ Aar; i Lagerøl over $6^2/_3$ Aar; i denne Vædske syntes dens Vegetation dog i eet Tilfælde at være død efter $1^2/_3$ Aars Forløb. Den havde endnu efter 4 Aar bevaret sit Liv i Gjærvand, og i Saccharose efter $1^1/_4$ Aar, men var død i sidstnævnte Vædske efter $1^1/_2$ Aar; paa Urt-Gelatine og Dobbeltøl-Gelatine holdt den sig levende over 5 Maaneder. I den indtørrede Tilstand paa Platintraadstykkerne vare Cellerne levende efter 4 Maaneder og døde efter 5 Maaneder.

Bact. Kützingianum var i Dobbeltøl levende over $3^5/_6$ Aar, i Lagerøl over $4^5/_6$ Aar, paa Urt-Gelatine og Dobbeltøl-Gelatine over 5 Maaneder.

Zeidlers i det foregaaende Afsnit (p. 315) nævnte Art holdt sig levende i Lagerøl over $3^1/_2$ Aar, og den sammesteds omtalte Art, som jeg havde udskilt af surt Dobbeltøl, var i den samme Vædske levende efter over 2 Aar; ved at undersøge dens Vegetationer i Dobbeltøllet viste det sig, at de bevarede deres Liv heri over $3^2/_3$ Aar.

Ovenstaaende Analyser falde i to Grupper, nemlig de, i hvilke Cellerne fandtes i et Næringssubstrat, og de, hvor dette ikke var Tilfældet.

I ethvert Næringssubstrat ville Cellerne danne et vist Antal Generationer. Selv om vi ved Tælning bestemme det Tidspunkt, da deres Antal ikke længere forøges, saa have vi dermed dog ikke bestemt det Tidspunkt, hvor Formeringen er standset. Efterhaanden som de gamle Generationer dø bort, opløses de nemlig og unddrage sig herved Iagttagelsen; samtidigt dannes der nye, og dette kan godt finde Sted i et saadant Forhold, at det hele Celle-Antal istedetfor at forøges endog bliver mindre, end det var tidligere. Vi kunne ikke bestemme, hvorlænge Nydannelsen foregaar, og altsaa heller ikke, hvilken Alder de sidstdannede Generationer have, naar vi anstille Prøven for Livsgrændsen. I de fleraarige Kulturer er det disse Celler, der give Udslag for Liv; thi i de Generationer, hvormed Kulturerne begyndte, kunne vi ikke længere vente at finde en eneste Celle i Live. Disse Undersøgelser give

os altsaa ingen Oplysninger om den enkelte Celles Livsgrændse, men derimod om Vegetationens under de givne Væxtforhold.

I de beskrevne Indtørringsforsøg standses Cellernes Formering hurtigt, og den iagttagne Livsgrændse er derfor ogsaa Livsgrændsen for de Celler, hvormed Forsøget begyndte. Vi saa da, at unge kraftige Celler af Bact. Pasteurianum, som bleve indtørrede ved almindelig Stuevarme, holdt sig levende omkring 4 Maaneder; efter 5 Maaneders Forløb var Døden indtraadt.

Den højeste Livsgrændse for Vegetationerne iagttoges i Lagerøllet. Bact. aceti og Bact. Kützingianum vare her levende, da Prøven blev anstillet efter henved 5, og Bact. Pasteurianum endnu efter omtrent 7 Aars Forløb. Det er endog sandsynligt, at disse Vegetationer kunne fortsætte deres Liv meget længere. En Uregelmæssighed viste sig deri, som det erindres, at en saadan Kultur af Bact. Pasteurianum var død allerede efter 1²/₈ Aars Henstand. Hvad Aarsagen hertil kan være, ved jeg ikke. Det er ikke utænkeligt, at Vegetationerne i Dobbeltøl kunne vise en ligesaa stor Levedygtighed; de ældste Kulturer, der bleve prøvede, vare levende, men havde endnu kun en Alder af henved 4 Aar.

Ifølge Ovenstaaende maa vi altsaa indtil videre betragte Lagerøllet som det bedste Opbevaringsmiddel for Eddikesyrebakterier.

---

### 3. Om Eddikesyrebakteriernes Forhold til Ølfabrikationen.

Eddikesyrebakterierne blive betragtede som meget farlige Sygdomsformer saavel i Vingjæringen som i Ølbryggerierne og i Brænderierne. Størst Skade gjøre de uden Tvivl Vinen; det er ikke sjeldent, at et Fad bliver saaledes angrebet af dem, at man, hvis man vil have noget Udbytte af Indholdet, maa lade Bakterierne fortsætte deres nedbrydende Værk, indtil al Vinen er omdannet til Eddike.

Af de foregaaende Undersøgelser have vi set, at disse Bakterier kun udvikle sig paa en kraftig Maade ved en høj Varmegrad, og naar de have rigelig Adgang til Luft. Alene heraf kunne vi slutte, at de næppe kunne være saa farlige for Undergjærings-Bryggerierne, som man i Almindelighed antager. I Overgjærings-Bryggerierne have de gunstigere Vilkaar og gjøre derfor ogsaa her mere Skade.

For at faa Klarhed over, hvorledes Eddikesyrebakterierne forholde sig, naar de indføres i Øllet paa Undergjæringens forskjellige Stadier, anstillede jeg nedenstaaende Forsøg.

I tre Kar, A, B og C, som stode i en almindelig Gjæringskjælder, blev der anbragt 1 Td. (1¹/₈ Hektoliter) Urt til Lagerøl, 14,1 % Ball.

Til A blev der sat 450 Gr. Carlsberg Undergjær Nr. 2.
- B - - - 450 - — — — og en Hinde, hvis Diameter var 3", af Bact. aceti.
- C - - - 450 Gr. Carlsberg Undergjær Nr. 2.

Saavel Paasætningsgjæren som Bakterie-Infektionen bestode af unge, kraftige Celler. Urtens Temperatur, da Gjæren blev sat til, var 7,8° C.

Efter 9 Døgn var Extraktmængden i A 6,27, i B 6,35 og i C 6,27 % Ball. Øllet havde den samme Lugt og Smag i alle tre Kar, og Klaringen var i alle Tilfælde god. Ved Prøven viste det sig, at kun Øllet af B indeholdt Eddikesyrebakterier, A og C vare fuldstændigt frie derfor. Til C blev der nu sat en lignende Hinde af Bact. aceti, som den, der ved Forsøgets Begyndelse blev sat til B. Derpaa blev alt Øllet fra hvert Kar aftappet paa to lige store Foustager, som bleve spundsede og lagte ned i en Lagerkjælder, hvis Temperatur var 2° C.

Efter 1¹/₂ Maaneds Lagring bleve nogle Flasker aftappede fra hver af Foustagerne og godt proppede. Disse Prøver forholdt sig i alle Tilfælde paa samme Maade; Øllet var blankt og havde god Smag og god Lugt. De bleve stillede ind i et mørkt Skab ved almindelig Stuevarme, og da de havde staaet her 14 Døgn, fandtes der paa Overfladen af Øllet fra B og C en svag Udvikling af Bact. aceti, paa Øllet af A derimod intet Spor deraf. Smagen og Lugten vedblev at være god i alle Tilfælde; Bakterie-Infektionen havde i den Henseende slet ikke gjort sig gjældende. Øllet vedblev ogsaa at være klart. Efter 4 Maaneders Lagring fik jeg væsentligt det samme Resultat.

Da Øllet havde tilbragt 5¹/₈ Maaned i Lagerkjælderen, blev der paa samme Maade som tidligere taget Prøver af A, B og C. Den ene Halvdel af Flaskerne blev godt proppet, den anden kun overbunden med et Lag Filtrerpapir; alle Flaskerne bleve stillede ind i en Thermostat ved 33° C. Undersøgelsen fandt Sted efter 12 Døgn. I ingen af Flaskerne med Propper fandtes der Bakterie-Udvikling, og dette gjaldt ligeledes om de med Filtrerpapir overbundne Flasker med Øllet fra A; kun i de med Filtrerpapir

overbundne Flasker fra B og C havde der udviklet sig en Hinde af Bact. aceti, og kun i disse var Øllet blevet eddikesurt.

Vi se altsaa, at Bact. aceti endnu var tilstede i levende Tilstand i det færdigt lagrede Øl, saavel naar Infektionen fandt Sted ved Hovedgjæringens Begyndelse som ved dens Slutning, men at den hverken gav sig tilkjende i Gjærings- eller i Lagerkjælderen; først naar det lagrede Øl blev aftappet og udsat for en højere Temperatur, kunde en Udvikling træde frem, men i de velproppede Flasker blev det dog ikke eddikesurt. Infektionen gjorde under disse Omstændigheder overhovedet ingen Skade. De sidst omtalte Prøver vise, at der, hvis vi overbinde Flaskemundingen med et Lag Filtrerpapir istedetfor at presse en god Prop deri, faaes en kraftig og tydelig Eddikesyredannelse. Selv om Temperaturen er gunstig, kan altsaa under de beskrevne Omstændigheder en god Prop forhindre, at Bakterierne gjøre Øllet Skade.

Med Bact. Pasteurianum anstillede jeg lignende Forsøg som de foran beskrevne; istedetfor Carlsberg Undergjær Nr. 2 blev her dog benyttet Carlsberg Undergjær Nr. 1. Hovedresultatet blev det samme.

Hvad her er sagt, gjælder ogsaa i alt Væsentligt, naar vi først indføre Eddikesyrebakterierne i undergjæret Øl, efterat det har forladt Lagerkjælderen. Hvis vi holde Luften borte, ville de ikke komme til Udvikling, selv om Øllet udsættes for en temmelig høj Varme. Til forskjellig Tid blev almindeligt Lagerøl, som paa sædvanlig Maade var aftappet paa Flasker, inficeret med unge, kraftige Vegetationer af Bact. aceti og Bact. Pasteurianum. Flaskerne bleve derpaa godt proppede og tilligemed Kontrolflasker hensatte ved almindelig Stuevarme i et mørkt Skab. Da de efter henved 14 Døgn bleve undersøgte, var Øllet i de inficerede Flasker af samme Beskaffenhed som i Kontrolflaskerne. Eddikesyrebakterierne havde ingen Virkning havt.

Naar Talen er om Eddikesyrebakterier, gjælder det altsaa fremfor Alt at drage Omsorg for, at Transportfadene og Flaskerne ere godt lukkede og selvfølgelig ogsaa godt fyldte.

---

## 4. Systematik.

Eddikesyrebakterierne blive, som vi foran have hørt, i Zopfs System henførte til Slægten Bacterium. Med den Viden, som vi for Øjeblikket have, kunne de ej heller anbringes paa en mere

passende Plads. I Almindelighed opfattes de som en særegen Gruppe indenfor den nævnte, meget store Slægt, en Gruppe, der fornemmelig udmærker sig derved, at dens Arter i fremtrædende Grad have den Evne ved Iltning at omdanne Alkohol til Eddikesyre. Cellerne have et stærkt udviklet Slimlag og ere mere eller mindre tilbøjelige til at danne Hinder; de optræde med de mest forskjellige Former: som smaa Stavbakterier, der ofte ere forenede i lange Kjæder, som Kokker, lange Traade og opsvulmede Former. Om den Lovmæssighed, der hersker i disse Formers Udvikling, er talt i 2det Kapitel. Hverken Endosporer eller Cilier ere hidtil iagttagne. De tre af mig nærmere undersøgte Arter gjøre ikke Næringsgelatinen flydende; i den historiske Indledning have vi imidlertid hørt, at andre Forskere have iagttaget Arter, hos hvilke dette er Tilfældet.

De morfologiske Udviklingsrækker bestemmes langt mere hos Bakterierne end hos de højere Planter af Dyrkningsforholdene; forandres disse, kunne, som vi foran have set, ogsaa Formerne selv og den Orden, hvori de optræde, blive anderledes. I Beskrivelsen af Arterne maa derfor Dyrkningsmaaden tillige angives. Dette er sket i den efterfølgende systematiske Fremstilling, men paa en kortfattet Maade, for at den ikke skulde tabe i Overskuelighed; Enkelthederne findes jo ogsaa foran.

Bact. aceti, Bact. Pasteurianum, Bact. Kützingianum, Bact. xylinum o. s. v. ville ved nøjere Efterforskning vistnok vise sig at være Betegnelser for Grupper af Arter; allerede i Øjeblikket kan det med Sikkerhed siges, at der findes et ikke ringe Antal, som kunne henføres under Navnet Bact. aceti; noget Lignende vil man sandsynligvis ogsaa senere finde for de Andres Vedkommende. Forskningens Vej er her den samme som overalt; efterhaanden som nærstaaende Arter opdages, maa man søge efter nye Karakterer, og disse blive som Regel i saadanne Tilfælde ogsaa hurtigt fundne.

Da det var min Opgave at give Bidrag til Eddikesyrebakteriernes Morfologi og Fysiologi, men derimod ikke at give Beskrivelser af de Arter, der overhovedet findes, saa har jeg indskrænket mine Undersøgelser over Systematiken til det nedenstaaende Omrids. I Beskrivelsen af de tre Arter, som jeg særligt har studeret, ere de Karakterer, hvorved de navnlig skjelnes fra hverandre, satte med spærret Skrift.

*A. Arter med Hinder, som let skilles ad, og hvis Slimdannelse kun kan iagttages ved en særegen Præparation.*

**1. Slimen farves ikke af Jodopløsning eller Jod-Jodkalium.**

Bacterium aceti. (Ulvina aceti Kützing 1837. Mycoderma aceti Thomson og Pasteur. Bacterium aceti Zopf).

Paa Dobbeltøl ved 34° C. danner den efter 1 Døgn en slimet, glat Hinde. Cellerne heri ere i Reglen timeglasformede Stavbakterier, der ere ordnede i Kjæder; kun undtagelsesvis findes længere Stave og Traade med eller uden Opsvulmninger (Fig. 2, p. 291). Ved 40—40½° C. udvikles lange tynde Traade. (Fig. 13, p. 314).

I Pladekulturer med Urt-Gelatine udvikler den efter 4 Døgn ved 25° C. runde, i Reglen hvælvede og helrandede, sjeldnere stjærneformede Kolonier; ved paafaldende Lys ere de graa, voxagtige, ved gjennemfaldende Lys blaalige. De bestaa hovedsageligt af frie, smaa Stavbakterier, Kjædeformen er tilbagetrængt. Kolonierne i Kjødvands-Pepton-Gelatine have væsentligt det samme Udseende; de ere dog omgivne af mælkeagtige Zoner, der atter ere adskilte hver fra sin Koloni ved et klart, ringformet Bælte. Draabeudsæd paa et tykt Lag Urt-Gelatine ved 25° C. udvikler efter 18 Døgn fladt udbredte, rundtakkede, rosetformede Kolonier. En lignende Udsæd paa et tykt Lag Dobbeltøl-Gelatine ved samme Varmegrad danner efter 2—3 Døgn runde, fladt udbredte Kolonier med hele, eller svagt bølgede Rande og tør Overflade; efter 18—20 Døgn antage ogsaa disse Rosetformen.

I Dobbeltøl er Temperatur-Maximum for Væxten c. 42° C., Temperatur-Minimum 4—5° C.

Den findes almindeligt, saavel i over- som i undergjæret Øl; jeg iagttog den ligeledes temmeligt hyppigt i Luftens Støv, og Holm fandt den af og til i sine Analyser af Vandet paa Gl. Carlsberg.

Nærstaaende Arter og i nogle Tilfælde vistnok identiske med den ovenstaaende ere dè af Peters, Lindner, Zeidler og Wermischeff iagttagne, ligeledes den af mig af eddikesurt, overgjæret Øl udskilte Art, som omtales p. 315.

**2. Slimen farves blaa af Jodopløsning og Jod-Jodkalium.**

Bacterium Pasteurianum. (Mycoderma Pasteurianum E. Chr. Hansen 1879. Bacterium Pasteurianum Zopf.)

Paa Dobbeltøl ved 34° C. udvikler den efter 1 Døgn en tør Hinde, som hurtigt bliver rynket og foldet, og som hæver sig

lidt over Vædskens Overflade. Dens Celler danne, ligesom hos Bact. aceti, lange Kjæder, men ere gjennemgaaende større, navnlig tykkere (Fig. 3, p. 292). Traadformen ved 40—$40^1/_2$° C. (Fig. 8, p. 307) er ogsaa lidt tykkere end hos Bact. aceti; denne Forskjel er ikke tilstrækkeligt fremhævet i Afbildningerne af de to Arter.

Kolonierne, som udvikle sig efter 4 Døgn ved 25° C. i Pladekulturer med Urt-Gelatine, ere i Regelen mindre end hos Bact. aceti, men ellers som hos denne Art. De bestaa hovedsageligt af typiske Kjæder. Kolonierne i Kjødvands-Pepton-Gelatine have det samme Udseende som hos sidstnævnte og ere omgivne af lignende Zoner. Draabeudsæd paa et tykt Lag Urt-Gelatine ved 25° C. udvikler efter 18 Døgn svagt hvælvede, helrandede eller svagt rundtakkede Kolonier med Foldninger. Paa Dobbeltøl-Gelatine danner en lignende Udsæd under de samme Omstændigheder Kolonier, som efter 2—3 Døgn ligne de tilsvarende Kolonier hos Bact. aceti, og som ligesom disse have en tør Overflade; efter 18—20 Døgn ere de udstyrede med Foldninger.

I Dobbeltøl er Temperatur-Maximum for Væxten c. 42° C., Temperatur-Minimum 5—6° C.

Bact. Pasteurianum findes paa de samme Steder som Bact. aceti, men er hyppigere i Overgjærings- end i Undergjærings-Bryggerierne.

Bacterium Kützingianum E. Chr. Hansen 1893.

Hinden, som dannes paa Dobbeltøl ved 34° C. efter 1 Døgn, ligner meget den foregaaende Arts, men adskiller sig fra denne derved, at den strækker sig højt op over Vædsken, opad Kolbens Væg. Den bestaar af smaa Stavbakterier, som hyppigst ere frie eller kun to og to forbundne og sjeldent danne længere Kjæder (Fig. 4, p. 292). Traadformen ved 40—$40^1/_2$° C. stemmer nærmest overens med Traadformen hos Bact. Pasteurianum, men indeholder forholdsvis flere korte Traade.

I Pladekulturer med Urt-Gelatine udvikler den efter 4 Døgn ved 25° C. Kolonier af samme Udseende som hos den foregaaende Art. De bestaa næsten udelukkende af frie, smaa Stavbakterier, kun meget sjeldent findes Kjæder deri. Kolonierne i Kjødvands-Pepton-Gelatine stemme overens med de tilsvarende Kolonier af Bact. aceti og Bact. Pasteurianum. Ved Draabeudsæd paa tykke Lag af Urt-Gelatine ved 25° C. udvikles der efter 18 Døgn Kolonier som hos Bact. Pasteurianum, men dog

tydeligt forskjellige fra dennes derved, at deres Overflade er jevn, uden Foldninger. En lignende Dyrkning paa Dobbeltøl-Gelatine giver efter 2—3 Døgn Kolonier som hos Bact. aceti og Bact. Pasteurianum, men med slimet Overflade; efter 18—20 Døgn ere disse Koloniers Overflade fremdeles jevn, uden Foldninger.

I Dobbeltøl er Temperatur-Maximum for Væxten c. 42° C., Temperatur-Minimum 6—7° C.

Den fandtes i Dobbeltøl; sandsynligvis har den en lignende Udbredelse som Bact. Pasteurianum.

*B. Arter med Hinde, hvis Slimdannelse bliver bruskagtig og sejg læderagtig.*

Bacterium xylinum. Adr. I. Brown 1886.

*December 1893.*

# Carlsberg Laboratoriet.

Juni 1894 (Fortsættelse fra 2. Bd. Side 357).

---

Laboratoriets Bestyrelse bestaaer for Tiden af: Professor S. M. Jørgensen, Formand, Brygger Kogsbølle, Directeur Kühle, Etatsraad Steenstrup og Professor Warming. Dens tidligere Medlem og Formand, Professor Barfoed, afgik ved Døden 30. April 1889. Til at indtræde i hans Sted i Bestyrelsen valgte Videnskabernes Selskab 24. Mai s. A. Professor Warming. Derefter valgte Bestyrelsen 31. s. M. Professor Jørgensen til Formand. Etatsraad Steenstrup, hvis Functionstid udløb 1890, gjenvalgtes 9. Mai s. A., Brygger Kogsbølle, hvis Functionstid udløb 1891, gjenvalgtes 15. Mai s. A., og Directeur Kühle, hvis Functionstid udløb 1892, gjenvalgtes 6. Mai s. A., Alle af Videnskabernes Selskab.

Laboratoriets Forstandere ere Hr. Professor Joh. Kjeldahl for den chemiske, og Hr. Professor Dr. phil. Emil Chr. Hansen for den physiologiske Afdeling.

Laboratoriets nuværende Assistenter ere: i den chemiske Afdeling Hr. Cand. polyt. H. Jessen-Hansen, ansat 1. Jan. 1892, og i den physiologiske Afdeling Hr. Cand. phil. & pharm. A. Kløcker, ansat 1. Febr. s. A. Fremdeles er Hr. Cand. polyt. I. Olsen fra 1. Febr. 1892 ansat som extraordinair Assistent i den chemiske, og Hr. Cand. polyt. H. Schiønning fra 1. Jan. 1894 som extraordinair Assistent i den physiologiske Afdeling. — Desuden har i den chemiske Afdeling Hr. Cand. mag., nuværende Overinspecteur ved Bryggeriet R. Koefoed været Assistent fra 1. Oct. 1887 til 28. Febr. 1890, Hr. Cand. polyt. Hagen Petersen midlertidig Assistent fra 1. Oct. 1889 og fast ansat fra 1. Jan. 1890 til 30. Nov. 1891. I den physiologiske Afdeling var Hr. Cand. pharm. J. C. Holm Assistent fra 15. Sept. 1884 til 31. Mai 1891 og Hr. Cand. pharm. Chr. Nielsen extraordinair Assistent fra 1. Aug. 1888 til 31. Mai 1893.

Laboratoriebestyrelsen nedsatte 23. Febr. 1892 et Udvalg til at udarbeide Plan til en ny Laboratoriebygning, i alt Væsentligt i Overensstemmelse med den tidligere Plan (sml. 2. Bd. Side 358), samt til to Forstanderboliger, og 22. Sept. s. A. forelagde Udvalget Planen for Bestyrelsen, som tiltraadte den og indstillede til Directionen for Fondet, at Bryggeriet til de nye Bygninger, som foresloges opførte paa Parcellen Nr. 19 r i Valby, maatte tilskyde indtil 50,000 Kr. aarlig i 4 Aar, medens Laboratoriet af sine Sparepenge skulde bidrage 100,000 Kr. til Bygningerne og desuden afholde Monteringen af det nye Laboratorium. Directionen tiltraadte denne Indstilling ved Skrivelse af 30. Nov. 1892

med den Bemærkning, at Byggeforetagendet vilde blive at lede af Bryggeriets Directeur under Tilsyn af Laboratoriebestyrelsens Formand. Funderingen paabegyndtes i Foraaret 1893, og Bygningen bragtes i dette Aar saa vidt som den efter Planen skulde, idet nemlig Kjelderetagen opførtes til Sokkelhøide.

Til Instrumenter, Apparater og andet Inventarium af forskjellig Slags er der i Laboratoriet i de sidste 6 Regnskabsaar, 1. Oct. 1887 til og med 30. Sept. 1893, tilsammen anvendt omtrent 11725 Kr. og ligesaa til Bøger omtr. 1460 Kr. Laboratoriets aarlige Udgift, derunder indbefattet Lønninger til de ved Laboratoriet ansatte Mænd, Reiseunderstøttelser og Udgivelse af „Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet“, har i de samme Regnskabsaar udgjort:

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| i | $18^{87}/_{88}$ | 21909 | Kr. | 31 | Ø. |
| - | $18^{88}/_{89}$ | 22184 | - | 38 | - |
| - | $18^{89}/_{90}$ | 22942 | - | 80 | - |
| - | $18^{90}/_{91}$ | 23251 | - | 70 | - |
| - | $18^{91}/_{92}$ | 22834 | - | 19 | - |
| - | $18^{92}/_{93}$ | 24555 | - | 76 | - |

Ved Udgangen af Regnskabsaaret $18^{92}/_{93}$ udgjorde Laboratoriets oplagte Sparepenge 150000 Kr.

Af de udgivne „Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet“ er ligesom tidligere uddelt omtr. 250 Expl. til Bibliotheker, Institutioner, Videnskabsmænd o. A. her hjemme og i Udlandet.

Ogsaa i det her omhandlede Tidsrum have ikke faa Videnskabsmænd og Bryggere fra Udlandet opholdt sig i kortere eller længere Tid ved Laboratoriet for at gjøre sig nærmere bekjendte med de der anvendte Arbeidsmethoder.

I 1890 valgtes begge Laboratoriets Forstandere til Medlemmer af det kgl. danske Videnskabernes Selskab, 1892 valgtes de ligeledes begge til Medlemmer af Videnskabernes Selskab i Christiania. Under 26. Mai 1892 udnævntes de efter Cultusministeriets Indstilling til Professorer. Under 31 Aug. 1889 udnævntes Hr. Dr. phil. E. Chr. Hansen til Ridder af Dannebrog. 1892 modtog han den italienske Kroneorden og 1894 den norske St. Olafs Orden.

# Table des matières du tome troisième.

## Première livraison, 1891.



## Deuxième livraison, 1892.

## Troisième livraison, 1894.

# Sur les méthodes de culture pure et spécialement sur la culture sur plaques de M. Koch et la limite des erreurs de cette méthode.

Par

**Just Chr. Holm.**

## I.

### Points principaux dans le développement des méthodes de culture pure.

La question de la production des cultures pures est loin d'être nouvelle; le principe sur lequel elles sont basées et qui aussi a été reconnu de tout temps, c'est qu'il faut prendre pour point de départ un individu isolé. Il va de soi qu'on doit, par cette voie, obtenir une culture pure. Mais les cultures pures servent à deux fins, car elles peuvent être employées soit dans des recherches sur l'évolution et la morphologie, soit dans des expériences physiologiques; de là un mode d'emploi différent, suivant qu'on expérimente dans un sens ou dans l'autre; dans le dernier cas, il faut opérer avec une culture en masse, chose qu'on cherche précisément à éviter, lorsqu'il s'agit d'obtenir des renseignements concernant l'évolution et la morphologie.

Avant d'aborder la question des cultures pures et d'en suivre brièvement le développement historique, je ferai seulement remarquer que les exposés qui en ont été faits jusqu'ici sont dus à des chimistes et à des médecins; ayant étudié la question comme botaniste, j'ai pu mettre en lumière quelques faits qui n'avaient pas encore attiré l'attention.

Comme cette voie a été inaugurée dans des recherches qui se rapportent à l'évolution et à la morphologie, nous passerons d'abord en revue les auteurs qui appartiennent à ce groupe.

M. Kützing (Grundzüge der philosophischen Botanik, I Bd, 1851, p. 233) dit que, pour observer la cellule de levûre pendant son développement, il a employé la méthode indiquée par M. Mitscherlich dans son Lehrbuch der Chemie I. p. 371, et il s'exprime comme il suit à ce sujet: „on délaye un peu de levûre haute fraîche dans du moût de bière et en étend une goutte avec du moût, jusqu'à ce qu'on n'observe qu'une ou deux cellules de levûre dans une goutte du liquide. Une de ces gouttes est mise sur un porte-objet, et ce dernier est recouvert d'une lame de verre couvre-objet qu'on y lute avec de la laque de copal. Le microscope est alors, avec la préparation, installé dans une pièce dont la température est comprise entre 18 et 20°. Il faut avoir soin que la première cellule soit placée exactement sur l'intersection des fils du micromètre, pour qu'on ne la confonde pas avec les cellules qui se développeront plus tard". Nous trouvons donc déjà chez Mitscherlich et Kützing non seulement le principe d'une seule cellule comme point de départ clairement énoncé, mais en même temps aussi l'indication d'une méthode pour en étudier le développement.

La germination d'un spore isolé, chez différents champignons, et les premières phases suivantes du développement ont déjà été observées par Ehrenberg (Epistola de Mycetogenesi, Nov. act. Acad. nat. cur. 1821), et, plus tard, notamment par M. Tulasne (Selecta fungorum carpologia; Paris, 1861) et M. De Bary (Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten; Leipzig, 1866). Ce dernier savant a procédé à des cultures pures de Mucorinées (A. de Bary und M. Woronin: Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Pilze, II Reihe; Frankfurt, 1866), en partant d'un sporange. Si la végétation que ces auteurs ont employée s'est réellement développée dans un espace exempt de germes, une culture pure pourra aussi, dans la plupart des cas, être obtenue de cette manière. M. Pasteur a plus tard (1872 et 1873) employé le même procédé.

Faisant un pas de plus, M. Brefeld a non seulement observé la germination d'un spore isolé, mais en a aussi, par un examen microscopique direct, suivi tout le développement jusqu'au moment où la plante issue du spore a elle-même produit des spores. Voici ce qu'il communique de son procédé (Methoden sur Untersuchung der Pilze; Landwirthschaftliche Jahrbücher, Jahrg. IV, 1875, p. 160—161): on prend quelques spores du champignon à examiner à l'aide d'une fine pointe d'aiguille, et les délaye dans une goutte d'eau bouillie sur un verre de montre, après quoi on ajoute assez d'eau pour qu'une petite goutte prise avec une pointe d'aiguille ne renferme qu'un ou deux spores, et place cette goutte sur un porte-objet. Le mieux est d'étendre celle-ci et, sauf un, d'enlever avec du papier à filtrer les autres spores

qui pourraient s'y trouver. Si les spores sont très petits, il faut d'abord les faire germer dans un liquide nourricier dans un verre de montre couvert, ce qui les fait fortement gonfler, et on les sème ensuite comme il est dit ci-dessus (ce procédé est aussi indiqué dans les „Botanische Untersuchungen über Schimmelpilze" de cet auteur, II Heft, 1874, p. 76 Anm.). Les cultures ici décrites sont appelées des cultures sur porte-objet. M. Brefeld se sert en outre d'un liquide nourricier; mais ce dernier ne doit pas se vaporiser, et il faut empêcher qu'il ne soit envahi par des spores étrangers. Dans tous les cas où l'on peut se contenter de recherches de courte durée avec 1 heure environ d'intervalle, il suffit de noter la place du spore et, après une observation rapide au microscope, de reporter la culture sur porte-objet sous une cloche humide. Mais si le spore et le champignon qui s'en développe doivent être soumis à un long examen, M. Brefeld ajoute de la gélatine au liquide nourricier pour l'empêcher de se vaporiser, et protège la préparation contre l'invasion de germes étrangers à l'aide d'un petit écran de papier fixé au tube du microscope. Il résulte de ce qui précède que la recherche ne se fait pas tout le temps au microscope, mais M. Brefeld a recours de temps à autre à un contrôle pour s'assurer que ses observations lui donnent le cycle complet du développement. Une observation continue, lorsqu'il s'agit de champignons assez grands, n'est même pas possible, en partie à cause de la grandeur que prend peu à peu l'objet examiné, en partie aussi parce que le développement demande à être peu à peu alimenté. M. Brefeld emploie aussi dans plusieurs cas des chambres humides. Il ressort clairement de ses communications sur ces dernières, dont il s'est servi, par exemple, dans ses recherches sur le Bacillus subtilis, qu'il a opéré avec un assez grand nombre de germes dans chaque chambre (Botanische Untersuchungen über Schimmelpilze, IV Heft, 1881, dans le chapitre Culturmethoden zur Untersuchung der Pilze).

On voit par la manière dont sont disposées les expériences de M. Brefeld, qu'il n'a pas toujours opéré sur des cultures absolument pures, surtout en ce qui concerne les cultures sur des porte-objet; mais, étant donné la nature du problème, ce n'est pas non plus nécessaire, il faut seulement qu'une infection venue du dehors n'entrave pas la croissance de l'organisme dont on veut étudier le développement. Ce qui caractérise la méthode de M. Brefeld, c'est l'observation microscopique directe de toutes les phases du développement, et non pas seulement de la germination dn spore et des premières phases qui la suivent, et si cette observation est rigoureusement faite, aucune erreur ne peut naturellement avoir lieu, même si un organisme étranger vient à commencer sa croissance à côté de celui qu'on étudie. Par consé-

quent, lorsqu'il s'agit de recherches sur l'évolution avec l'individu comme point de départ, il n'est non seulement pas nécessaire d'opérer avec une seule cellule dans la chambre humide ou sous le microscope — ce que M. Brefeld fait aussi ressortir dans son dernier mémoire de 1881, p. 18 — mais il est bon, au contraire, d'en avoir plusieurs, de préférence autant que possible, pour pouvoir retirer de l'expérience le plus d'observations possible; en un mot, on peut bien opérer sans culture pure.

En cela consiste la différence essentielle entre ce genre d'expériences et celles qu'il faut faire lorsqu'on veut produire des cultures en masse en vue de recherches physiologiques. Le contrôle direct du microscope est impossible ici, d'autres facteurs interviennent, et c'est pourquoi la méthode est aussi différente, bien qu'en principe elle doive être la même, Les méthodes décrites plus haut ne peuvent, dans ces circonstances, par suite plus servir. Pour produire ces cultures en masse, quelques auteurs emploient des liquides nourriciers, d'autres au contraire des substratum solides.

Les liquides s'emploient, partie dans la méthode physiologique de culture pure (Pasteur et plusieurs de ses contemporains), partie dans la méthode dite de dilution ou de dissémination (Lister, Hansen).

Parmi les auteurs qui ont traité la question au point de vue physiologique, nous citerons spécialement M. Pasteur (Etudes sur la bière, 1876, Chap. V, p. 224—227). Ce que M. Pasteur et les auteurs qui emploient la méthode physiologique pour la production des cultures pures donnent pour base à cette méthode, ce sont les différentes propriétés physiologiques des divers microorganismes et, en particulier, la circonstance qu'ils peuvent être plus ou moins prolifiques dans différents liquides nourriciers et, si ces derniers sont défavorables, manifester une force de résistance plus ou moins grande, de sorte que quelques-uns peuvent y vivre plus longtemps que d'autres. Il s'établit donc entre les espèces une concurrence qui a pour résultat que l'espèce la plus forte. c'est-à-dire la plus prolifique, finit par avoir le dessus; mais il est toujours possible que l'espèce ou les espèces plus faibles ne soient qu'entravées dans leur développement sans cependant être tuées, et que, les conditions devenant défavorables pour l'espèce d'abord favorisée, elles l'emportent à leur tour sur leur rivale, de même qu'il peut aussi arriver que deux ou plusieurs espèces soumises à ce traitement y opposent la même résistance. C'est donc en grande partie le hasard qui décide s'll est possible ou non, par cette méthode, d'obtenir une culture pure. Dans la présente livraison des Comptes-rendus des travaux du laboratoire de Carlsberg, M. Hansen donne un exposé détaillé des

méthodes de M. Pasteur et de leur portée, en l'accompagnant d'expériences auxquelles j'ai pris part.

Après avoir parlé de la méthode physiologique, nous décrirons maintenant en peu de mots la méthode de dilution en citant les principaux auteurs qui s'en sont servis. Elle a été inaugurée par M. Lister, qui l'a employée pour préparer une culture pure d'une bactérie de l'acide lactique. Il décrit en détail son procédé dans deux mémoires (On the nature of fermentation; Quaterly Journal of microscopical science, 1878, Bd. 18, p. 190, et: On the lactic fermentation and its bearing on pathology; Transactions of the Pathological Society of London, 1878, Bd. 29, p. 445). „L'idée me vint — dit-il dans son premier mémoire — que si l'on pouvait, avec un certain degré d'exactitude, calculer le nombre des bactéries contenues dans une quantité déterminée de lait acide, et qu'on étendît alors le lait d'une quantité correspondante d'eau bouillie, on pourrait alors traiter ce lait ainsi dilué de manière que chaque goutte dont serait infecté du lait bouilli en vînt à renfermer en moyenne une seule bactérie". A l'aide d'une seringue spéciale, il dépose, par exemple, $^{1}/_{50}$ de goutte sur une lame porte-objet et la couvre d'une lamelle de verre dont il connaît la grandeur par rapport au champ de vision du microscope. La goutte est juste assez grande pour être couverte exactement par la lamelle couvre-objet. En comptant alors les bactéries dans plusieurs champs visuels et déduisant de là la moyenne pour l'un d'eux, puis en supputant combien il y a de champs visuels sur la lamelle, il calcule combien il y a de bactéries dans $^{1}/_{50}$ de goutte et, ensuite, combien il faut ajouter d'eau stérilisée pour que chaque cinquantième de goutte ne renferme en moyenne qu'une seule bactérie.

Environ le même procédé a été employé plus tard par MM. Nägeli et Fitz.

Même si la dilution a été poussée si loin qu'on n'observe de développement que dans un petit nombre des ballons infectés, tandis que les autres restent stériles, ce n'est cependant nullement une preuve que les ballons infectés contiennent des cultures pures; c'est ce qu'ont, entre autres, souvent montré les nombreuses analyses d'eau que j'ai entreprises dans les dernières années.

En combinant la dissémination des cellules avec une numération, cette méthode, si le calcul est juste, devient, il est vrai, plus sûre; mais une numération exacte des individus contenus dans un certain volume du mélange ne peut se faire de cette façon s'il s'agit de bactéries, et une répartition uniforme des cellules est très difficile, pour ne pas dire impossible. Mais fût-il même possible de surmonter ces difficultés, on verrait alors surgir une nouvelle question: à quoi peut-on

reconnaître que ce résultat a été réellement atteint? Comment est-on en état de distinguer les ballons qui n'ont été infectés que d'une cellule de ceux qui, en dépit du calcul, l'ont été de plusieurs?

C'est, comme nous allons le voir, M. Emil Chr. Hansen qui, le premier, a résolu cette question et, par là, rendu exacte la méthode de dilution. La première communication de sa méthode a paru dans les Comptes-rendus des travaux du laboratoire de Carlsberg, Vol. I, Livr. 4, p. 212. Copenhague 1881, Librairie Hagerup, et il en a publié une description détaillée dans le II[e] volume du même ouvrage, 2[e] livr., 1883, dans le mémoire sur la formation des ascospores chez le genre Saccharomyces, paragraphe „Méthodes" p. 20 et suivantes du résumé français. La méthode de dilution de M. Hansen contient deux points nouveaux importants, à savoir un moyen de faire une numération exacte et un signe qui permet de décider si un ballon, après l'infection, a reçu une ou plusieurs cellules. La numération s'exécute à l'aide d'un carré de 4 mm. de côté gravé au milieu d'une lamelle couvre-objet, et dans lequel on place une goutte du liquide dilué après l'avoir secoué. La goutte doit être assez petite pour ne dépasser en aucun point les limites du carré; ce dernier est en outre divisé en petits carrés, ce qui permet de compter exactement toutes les cellules. On peut aussi, à l'aide de cette lame de verre, semer directement une seule cellule; mais il faut alors que la dilution soit assez forte pour que la goutte ne renferme qu'une cellule, et introduire ensuite la lame dans un ballon contenant un liquide nourricier. Le signe auquel on reconnaît si un ballon, après l'infection, a reçu une ou plusieurs cellules, consiste dans le nombre des taches de levûre qui se forment sur les parois et le fond des ballons infectés et, après cela, fortement secoués. Les ballons qui ne présentent qu'une seule tache de levûre sont les seuls dont on puisse dire avec certitude qu'ils renferment une culture pure provenant d'une cellule unique.

A l'aide de cette méthode, M. Hansen a préparé toutes ses cultures pures des 6 espèces de Saccharomyces qu'il a décrites en 1882—1883, ainsi que ses cultures pures sur une grande échelle dans la brasserie de Vieux Carlsberg.

Mais la méthode de dilution de M. Hansen ne peut être appliquée que lorsqu'on opère sur des cellules dont la densité est telle qu'elles se précipitent. Aussi n'a-t-elle été employée que pour les cultures pures des cellules de levûre; elle n'a reçu aucune application dans le domaine de la bactériologie proprement dite, même les masses de Zooglões ne peuvent être contrôlées de cette manière dans des liquides. Il faut que les cellules puissent se fixer aux parois du verre; si cette condition n'est pas remplie, aucune observation certaine n'est possible.

Les méthodes de dilution avec des liquides ne s'emploient maintenant que rarement, depuis que les méthodes plus commodes et moins chères qui ont pour substratum la gélatine ont été mises en usage.

Nous avons déjà vu que, dans la préparation des cultures en masse, on a, outre les liquides, employé aussi un substratum solide. M. Schroeter, dans ses recherches sur les pigments produits par les bactéries (Ueber einige durch Bakterien gebildete Pigmente; Beiträge zur Biologie der Pflanzen. I Bd., 2tes Heft, 1872, p. 109), leur donne entre autres pour substratum des tranches de pommes de terre. Il avait remarqué que, sur des tranches de pommes de terre qui étaient restées quelque temps exposées à l'air, il se développait des taches ou des gouttes de forme et de couleur variables; chacune de ces taches se composait d'une espèce déterminée de microorganismes qui pouvaient ainsi, pendant un certain temps, se développer indépendamment les uns des autres. C'est de cette façon qu'il devint le fondateur de la méthode de culture pure sur un substratum solide.

M. Robert Koch a essentiellement perfectionné cette méthode. Il donne des renseignements à ce sujet dans son mémoire „Zur Untersuchung von pathogenen Organismen“ (Mittheil. aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte. I Bd. Berlin, 1881, p. 1), et relève comme quelque chose de spécial à sa méthode, que le substratum, outre qu'il est solide, a l'heureuse propriété d'être assez transparent, et que de plus il est possible de varier l'aliment entremêlé dans la gélatine, suivant que l'exigent les différents microorganismes qui y sont cultivés.

Le premier procédé de M. Koch (1881) consistait à répartir les germes dans des raies tracées à côté les unes des autres dans la gélatine figée, à l'aide d'un fil de platine stérilisé qui était trempé une seule fois dans le liquide infecté, de sorte que les dernières raies ne contenaient que peu de germes, et que les colonies qui s'en développaient étaient isolées. Mais cette méthode, on le voit facilement, n'est rien moins que fine; car, en réalité, beaucoup de ces colonies isolées ne se composent pas exclusivement d'une seule espèce, mais de plusieurs. On a, jusqu'en 1883, employé ce procédé dans le laboratoire de M. Koch.

Mais M. Koch a remplacé plus tard cette méthode par une autre, celle dite des cultures sur plaques, qui a été exposée pour la première fois par M. Koch, lors d'une exposition d'hygiène, au 11e congrès des médecins allemands, à Berlin, en 1883. Dans cette méthode, on répartit les germes en les secouant dans de la gélatine nourricière liquide; lorsqu'elle se fige, les germes s'y fixent et peuvent se développer en colonies indépendantes les unes des autres. M. Koch en détermine la pureté d'après leur aspect, leur couleur, leur forme, l'aptitude des bactéries à produire des peptones, etc. En ce qui concerne

la répartition des germes, il applique en réalité le même principe que dans les anciennes méthodes de dilution avec des liquides; mais il manque également ici un point de départ certain, que, pour un grand nombre de bactéries, il n'est cependant guère possible de s'assurer. Ici, comme dans la méthode de M. Lister, il y a des probabilités pour la production d'une culture pure, mais la certitude manque. Elle s'acquiert seulement lorsque, dès l'origine, après la répartition des cellules dans la gélatine, on observe un germe isolé et son développement, jusqu'à ce qu'il ait formé une colonie facile à reconnaître à l'oeil nu.

C'est ce qu'a fait M. E. Chr. Hansen pour les cellules de levûre (Comptes-rendus des travaux du laboratoire de Carlsberg, vol. II, liv. 2, 1883, p. 28 et liv. 4, 1886, p. 94—104). Après la répartition des cellules dans la gélatine nourricière, il en met une partie dans une chambre humide, où il peut observer les dfffférentes cellules, en marquer la place, en suivre le développement sous le microscope et choisir ainsi la tache végétative dont il se servira plus tard pour préparer une culture en masse. Ce procédé rigoureux n'a été appliqué qu'exceptionnellement aux bactéries, et semble aussi, pour le moment, ne pouvoir être employé à l'égard de beaucoup de ces formes. Dans tous ces cas, la méthode de culture sur plaques de M. Koch est toujours le meilleur procédé à suivre.

Depuis le temps d'Ehrenberg et de Kützing, les botanistes ont employé des cultures pures dans les recherches concernant l'évolution et la morphologie, et observé rigoureusement le principe d'une cellule comme point de départ. M. Hansen appartient à cette catégorie, mais il est en même temps le seul qui ait maintenu le même principe dans les recherches physiologiques, où le but de la culture pure est d'obtenir une culture en masse.

Ce court aperçu nous a ainsi montré que le même principe, l'emploi de l'individu ou de la cellule isolée comme point de départ, a très certainement été reconnu depuis longtemps. Mais les différents auteurs ont été plus ou moins conséquents dans l'observation de ce principe, et on peut même dire qu'il y a eu des périodes où l'on ne s'est guère préoccupé d'un pareil point de départ, car plusieurs des savants qui se sont livrés à la recherche de méthodes de cultures pures, ont mis tous leurs soins à obtenir un résultat par la voie la plus courte et la plus facile, afin de s'épargner le travail long et pénible que demande une telle recherche lorsque le principe, l'individu comme point de départ, doit être suivi dans toutes ses conséquences. On a en général beaucoup abusé de la notion de culture pure en voulant y mettre plus qu'elle ne renferme en réalité. La culture pure

est très certainement un moyen technique fort précieux, mais pas davantage; c'est seulement par l'emploi qu'on en fait et par les résultats qu'elle donne lorsqu'elle est mise au service de la recherche scientifique, qu'elle acquiert une plus grande importance.

Cet aperçu nous a en outre montré comment la méthode dont il s'agit s'est développée petit à petit, chaque auteur s'étant toujours appuyé sur son devancier; la manière de procéder et la technique ont seules différé chez le différents auteurs.

---

## II.

## Expériences sur les limites des erreurs dans la culture sur plaques de M. Koch.

En parlant, à la fin du chapitre précédent, de la culture sur plaques de M. Koch, j'ai fait observer que les cultures obtenues par cette méthode, bien qu'elles soient souvent absolument pures, ne le sont cependant pas toujours, vu qu'il est très difficile, pour ne pas dire souvent impossible, dans la gélatine, de séparer par des secousses les germes de bactéries et d'autres microorganismes, la masse gélatineuse qui les entoure les agglutinant très souvent ensemble.

M. Hansen a déjà, en 1883, soumis cette méthode à un contrôle en expérimentant sur un mélange de deux espèces de levûres qui peuvent facilement, sous le microscope, être distinguées l'une de l'autre, à savoir le Sacch. apiculatus et une espèce du groupe Sacch. cerevisiæ, et le résultat a été que 98 % environ des colonies qui se sont développées renfermaient des cultures pures[1]). M. Hansen examine ensuite comment on peut éviter les végétations impures qui se produisent cependant comme des exceptions menaçantes. L'examen microscopique ne peut servir que dans les cas très rares où la levûre en question est assez caractéristique pour être facilement reconnaissable.

---

[1]) Plus tard, M. P. Miquel a effectué un contrôle analogue pour des bactéries, en transportant, à l'aide d'un fil de platine, dans de l'extrait de viande et de peptone des semences de 100 colonies d'une culture sur plaques provenant d'une analyse d'air, et en constatant ensuite par un examen microscopique que, de ces 100 colonies, il s'était développé 134 organismes différents. L'erreur était donc dans ce cas considérable. (Dixième mémoire sur les poussières organisées de l'air et des eaux: Annuaire de Montsouris, 1888. Ref. dans Centralblatt f. Bakteriologie u. Parasitenkunde, Bd. IV, 1888, p. 278).

Le danger des erreurs est naturellement d'autant plus diminué que l'espèce désirée est plus prédominante, de même qu'il l'est aussi, si l'on répète l'expérience de façon que la première soit le point de départ de la deuxième et celle-ci de la troisième, etc.; mais on n'obtient pas cependant par ce moyen une certitude satisfaisante, on opère toujours au hasard et ne dispose d'aucun contrôle qui permette de décider si le but qu'on se propose a été atteint ou non. M. Hansen termine en ces termes ses remarques à ce sujet: „la seule voie par laquelle nous puissions obtenir la certitude absolue qu'une tache est formée d'une ou de plusieurs cellules, c'est d'entreprendre une culture dans une chambre humide". C'est ce procédé qu'il a employé depuis 1883.

Pour ce qui regarde les bactéries, on ne pourra pas, dans beaucoup de cas, se servir de la méthode de M. Hansen, et celle de M. Koch reste donc la meilleure. Mais il en est autrement des cellules de levûre et d'autres microorganismes analogues; la méthode de M. Hansen, à cause de la certitude qu'elle donne, est alors absolument à préférer. Elle présente, il est vrai, de plus grandes difficultés dans son exécution, et c'est un des motifs pour lesquels elle n'est en général employée que par les botanistes et les physiologues qui s'occupent des fermentations, mais rarement par les médecins bactériologues, pas même s'il s'agit d'une culture pure de cellules de levûre; un autre motif, c'est que la limite des erreurs dans la culture sur plaques n'est jusqu'ici pas clairement établie.

La méthode de M. Hansen étant, comme nous l'avons fait remarquer, assujétissante, il se pose tout naturellement la question de savoir si elle est réellement nécessaire. Au point de vue théorique, nous devons assurément répondre tout de suite affirmativement; mais en fait de recherches particulières pouvant nous en démontrer pratiquement la nécessité, il n'y en a qu'une seule, à savoir celle qui a été mentionnée plus haut par M. Hansen. Il y a donc tout lieu de soumettre cette question à un nouvel examen, et c'est ce que j'ai fait dans les recherches suivantes en n'opérant cependant, par les motifs exposés plus haut, que sur des cellules de levûre et non sur des bactéries.

Par les expériences que j'ai faites au laboratoire de Carlsberg dans le cours des années 1889 et 1890, j'ai pu constater, en ce qui concerne les Saccharomyces et les cellules ressemblant à des Saccharomyces, qu'il n'est pas si rare qu'une colonie qui, à en juger d'après l'extérieur (sa forme ronde et sa situation isolée), comme aussi d'après une analyse microscopique, semble se composer d'une seule espèce, en renferme en réalité plusieurs, ou, si l'expérience n'a été faite qu'avec une seule espèce, qu'une colonie qu'on devait supposer n'être issue que

d'une seule cellule, s'est montrée formée de deux ou de plusieurs cellules, ce qui, par rapport à la méthode, est la même chose.

Comme très peu d'espèces de cellules de levûre ont une forme telle qu'elles puissent, sous le microscope, se distinguer d'autres espèces, il n'y a qu'un procédé à employer si l'on veut essayer de déterminer la limite des erreurs dans la méthode de culture sur plaques, et n'opère pas justement sur une forme facile à reconnaître, comme dans l'expérience de contrôle, mentionnée plus haut, que M. Hansen a faite en 1883, et c'est, aussitôt après la dissémination dans la gélatine d'examiner la place des différentes cellules, et à l'aide de quelque appareil, de noter leur situation réciproque. C'est ce dernier procédé que j'ai adopté dans les expériences qui suivent.

Ces expériences sont plus rigoureuses et plus complètes que celle de M. Hansen, car on est toujours exposé, dans cette dernière, à trouver un résultat plus favorable qu'il ne l'est en réalité; on est, par exemple, souvent hors d'état de découvrir dans les taches des mélanges étrangers.

Les préparatifs, aussi bien que la description de la culture pure et du contrôle qui l'a suivie, ont déjà été exposés par M. Hansen dans le mémoire déjà cité, dans les Comptes-rendus des travaux du laboratoir de Carlsberg, vol. II. liv. 4, p. 95—101. Comme je l'ai indiqué plus haut, c'est cette méthode que j'ai employée dans les analyses qui suivent.

La levûre dont je me suis servi se composait, dans quelques expériences, de cellules jeunes et vigoureuses prises au commencement de la fermentation et, dans d'autres, au contraire, de cellules prises à la fin de la fermentation, par conséquent d'individus plus âgés et moins vigoureux. J'ai employé différentes levûres de bière, à savoir: les levûres basses nº 1 et 2 de Carlsberg, le Sacch. cerevisiæ I Hansen (levûre haute d'Edimbourg), une levûre haute helge, et en outre un Sacch. Pastorianus, le Sacch. exiguus, le Sacch. membranæfaciens Hansen, le Mycoderma cerevisiæ, le Sacch. apiculatus et de petites cellules rondes ressemblant au Sacch. minor Engel, mais ne produisant pas d'ascospores. J'ai opéré en partie sur chaque espèce à part, en partie sur des mélanges de plusieurs espèces.

On délaye un peu de cette levûre dans un ballon avec de l'eau stérilisée et, après l'avoir fortement secoué, on porte, à l'aide d'un fil de platine, une quantité très petite du mélange dans un ballon renferment de la gélatine avec du moût de bière (à 33° C. environ). Le secouement dans l'eau sert non seulement à délayer la levûre, mais en même temps aussi à en séparer les cellules, pour que l'expérience, également sous ce rapport, puisse se faire dans des circonstances aussi

favorables que possible. Après que ce dernier ballon a été secoué quelque temps pour obtenir une répartition plus égale des cellules dans la gélatine, on verse une quantité convenable de celle-ci sur des lamelles couvre-objet (de 30 millimètres de diamètre), qui, la gélatine une fois figée, sont placées sur des anneaux de chambres humides. Dès que ces chambres sont prêtes, il faut les examiner aussi vite que possible; dans ce but, à l'aide du marqueur (Objectmarkirer, Klónne & Müller, Berlin), je marquais différentes parties, dont je comptais les cellules, et dessinais le tout (la situation des cellules, etc.) sur une feuille de papier pour m'en servir comme contrôle au bout de 1 et 2 jours. Avec le marqueur dont il s'agit, on trace sur la lamelle couvre-objet un petit anneau coloré dont le diamètre est de 0,5 de millimètre environ, c'est-à-dire qui délimite une partie de la gélatine correspondant exactement à la grandeur d'un champ visuel, lorsqu'on se sert de l'objectif IV et de l'oculaire I (Seibert).

Dans l'examen des cellules et de colonies auxquelles elles donnaient naissance, j'ai suivi les règles suivantes. Les cellules ayant poussé des bourgeons distincts étaient regardées comme des cellules isolées, et là où il y avait le moindre doute si j'avais devant moi deux cellules contiguês ou une cellule avec un bourgeon complètement développé, je le comptais pour une seule cellule ou ne le faisais pas du tout entrer en ligne de compte. Lorsque deux cellules étaient si voisines qu'elles auraient formé une seule tache si elles avaient pu, soit toutes les deux, soit l'une d'elles seulement, développer des colonies, mais ne donnaient aucune d'elles signe de vie dans la gélatine, je n'en tenais pas non plus compte par rapport à la question dont il s'agit ici. Si deux taches ne se confondaient qu'en partie, mais pouvaient encore par un faible grossissement être reconnues comme formant deux colonies indépendantes, je les comptais pour deux. Comme constituant des erreurs, j'ai seulement compté les cas où, après un repos de 48 heures à la température de 22° C., j'ai constaté avec certitude que deux ou plusieurs cellules avaient formé une seule colonie, qui ne présentait pas trace d'une fusion de deux ou plusieurs taches, mais semblait au contraire avoir pu être formée par une seule cellule. Dans mon calcul des erreurs auxquelles la méthode de culture sur plaques peut donner lieu, j'ai ainsi trouvé une proportion % plutôt trop petite que trop grande.

Si j'ai attendu 48 heures avant de commencer mes recherches, c'est qu'en général on a seulement alors des colonies suffisamment grandes. Au bout de ce temps, elles peuvent, du moins le plus souvent, être bien visibles à l'œil nu, lorsqu'on emploie la gélatine mélangée

de moût de bière comme substratum, de même qu'il est facile, à l'aide d'un fil de platine, d'en transporter une particule dans le milieu nourricier qu'on a choisi. Un séjour plus long à la température de 22° C. produirait un plus grand nombre de fusions entre les taches végétatives. Considéré à ce point de vue, mon procédé ne nous renseigne par conséquent que sur la limite inférieure des erreurs qu'entraîne la méthode des cultures sur plaques. Il va du reste sans dire que j'ai fait tout ce qui était en mon pouvoir pour rendre la dissémination des cellules dans la gélatine aussi complète que possible.

Je ferai aussi remarquer que la plupart de mes expériences ont été faites avec la gélatine que M. Hansen emploie d'ordinaire pour les Saccharomyces et les cellules ressemblant à des Saccharomyces (moût de bière avec addition de 5—6 % de gélatine). C'est seulement dans quelques cas particuliers que je me suis servi d'autres gélatines nourricières, par exemple de celle dont M. Koch se sert habituellement pour les bactéries, à savoir la gélatine mélangée d'extrait de viande et de peptone.

Il est arrivé assez souvent que, de deux cellules voisines, une seule a formé une colonie, qui, en continuant à croître, s'est approchée de la seconde cellule et l'a absorbée avant que les 48 heures fussent écoulées. De cette dernière cellule, nous ne savons rien; peut-être est-elle morte, peut-être est-elle seulement si affaiblie qu'elle n'a pu se développer dans la gélatine, qui, en pareille circonstance, est un mauvais substratum. Dans le premier cas, peu importe qu'on la prenne avec soi en transportant la tache ou une partie de celle-ci dans le substratum nourricier où l'on désire continuer la culture; dans le second cas, au contraire, cela n'est pas tout à fait sans importance, car la cellule affaiblie peut trouver dans ce nouveau substratum un milieu qui lui convient et, par conséquent, elle peut bien, malgré la concurrence, commencer à bourgeonner, de sorte que — si cette cellule appartient à une autre espèee — on en viendra à travailler non avec une culture pure, mais avec des matériaux impurs, ce qui peut avoir des conséquences incalculables.

Je procédais donc comme il suit. Je marquais un certain nombre de cellules, parmi lesquelles il y en avait presque toujours quelques-unes qui, au bont de 48 heures, n'avaient pas poussé de bourgeons ni formé de colonies, puis après avoir retranché celles-ci, je notais le nombre des colonies formées par le reste des cellules marquées et en déduisais le rapport pour 100 colonies. J'avais ainsi, dans l'expérience 1, marqué 63 cellules, dont 14 ne se sont pas développées et les 49 autres n'ont produit que 44 colonies; par conséquent 100 colonies ont, dans cette expérience, été formées non par 100 cellules, mais par 111.

La grandeur des colonies — en supposant qu'on se sert d'une gélatine nourricière déterminée — dépend en partie de la circonstance si une goutte d'eau a été mise ou non au fond de la chambre humide, les colonies, dans le dernier cas, étant en général plus petites, en partie peut-être souvent aussi de la place que les cellules de levûre occupent dans la gélatine, les colonies qui se forment à la surface ou en sont très voisines, s'étendant plus rapidement que celles qui sont plus profondes. Cependant ce n'est pas toujours le cas que les colonies de la surface s'étendent dans le sens de la largeur, on les voit quelquefois sous la forme d'un cône à pointe souvent recourbée, caractère qui n'est pas particulier à quelque espèce, mais commun à plusieurs microorganismes, tant chez les Saccharomyces que chez les Non-Saccharomyces. Enfin la grandeur des colonies peut dépendre de l'espèce de la levûre, car certaines petites formes ont une tendance à former de petites colonies, mais ce ne sont pas toutes les petites cellules qui donnent de petites colonies.

Nous en venons maintenant à l'objet principal de nos recherches, à savoir la grandeur des erreurs qui peuvent se produire dans l'emploi de la méthode de culture sur plaques de M. Koch.

J'ai, dans le tableau ci-dessous, donné le résultat des 23 expériences que j'ai faites dans ce but, et indiqué en même temps pour chacune d'elles l'espèce de levûre dont je me suis servi.

| Expériences | | 100 colonies formees par |
|---|---|---|
| 1. | Levûre basse de Carlsberg N° 1 . . . . . . . . . . . | 111 cellules |
| 2. | do. do. . . . . . . . . . . . | 106 — |
| 3. | do. do. . . . . . . . . . . . | 104 — |
| 4. | Levûre basse de Carlsberg N° 2 et Sacch. apiculatus | 135 — |
| 5. | do. N° 1 . . . . . . . . . . . | 111 — |
| 6. | do. do. . . . . . . . . . . . | 103 — |
| 7. | do. do. . . . . . . . . . . . | 110 — |
| 8. | do. N° 2 et Sacch. exiguus . | 107 — |
| 9. | do. do. et do. | 108 — |
| 10. | do. do. et do. | 112 — |
| 11. | do. do. et do. | 105 — |
| 12. | Levûre basse de Carlsberg N° 1 . . . . . . . . . . . | 104 — |
| 13. | Sacch. cerevisiæ I. Hansen . . . . . . . . . . . . . . | 108 — |
| 14. | Levûre basse de Carlsberg N° 1 . . . . . . . . . . . | 105 — |
| 15. | Sacch. apiculatus et Sacch. exiguus . . . . . . . . . . | 114 — |
| 16. | do. do. . . . . . . . . . . | 105 — |
| 17. | do. do. et Mycod. cerevisiæ | 109 — |
| 18. | Sacch. exiguus et Mycod. cerevisiæ . . . . . . . . . | 118 — |

| Expériences | | 100 colonies formées par |
|---|---|---|
| 19. | Sacch. exiguus, Sacch. apiculatus et Mycod. cerevis. | 111 cellules |
| 20. | Levûre haute belge, Sacch. Pastorianus et Mycod. cerevisiæ | 100 — |
| 21. | Sacch. Pastorianus et Sacch. membranæfaciens | 109 — |
| 22. | Levûre basse de Carlsberg N° 2 et petites cellules rondes de levûre | 102 — |
| 23. | Levûre basse de Carlsberg N° 2 | 107 — |

Quels résultats pouvons-nous déduire de ces expériences? La méthode de culture sur plaques de M. Koch ne nous a donné que dans 1 cas sur 23 des cultures pures complètes, à savoir dans l'expérience 20, où toutes les cellules marquées étaient placées de manière qu'aucune des taches qu'elles ont formées ne s'est fusionnée avec d'autres; 100 colonies ont été formées par 100 cellules, ce qui n'a été le cas dans aucune des autres expériences. Ces expériences nous montrent combien on peut souvent commettre une erreur puisque, d'après elles, 4—5 % seulement des cultures sur plaques de M. Koch donnent des résultats tout à fait satisfaisants, c'est-à-dire tels que chacune des colonies de la plaque renferme une culture absolument pure. Le maximum de l'errreur nous est donné qar l'expérience 4, où 100 colonies sont formées par 135 cellules; comme moyenne générale, nous trouvons que 100 colonies sont formées par 108 cellules. Nous ne pouvons jamais de cette manière avoir une complète certitude, nous ne savons pas en réalité quand nous avons ou non une culture pure; comme je l'ai déjà fait remarquer, ce qui manque, c'est un point de départ certain.

Toutes les espèces de levûres que nous avons employées semblent présenter cette particularité, que les cellules prises au commencement de la fermentation se séparent plus difficilement les unes des autres que celles qui sont prises à la fin de la fermentation. Si nous prenons la moyenne des expériences faites avec la levûre du commencement de la fermentation, nous trouvons que 100 colonies sont formées par 110 cellules (nombre maximum, 135); minimum, 100), tandis que pour la moyenne des analyses faites avec la levûre de la fin de la fermentation, nous trouvons que 100 colonies sont formées par 107 cellules (nombre maximum, 111; minimum, 103). De là on peut tirer cette conclusicn, que l'erreur commise en employant la culture sur plaques est moindre si les cellules proviennent de la fin de la fermentation que si elles proviennent du commencement de celle-ci. Mais, dans la règle, on ne peut, par de raisons pratiques, prendre pour

point de départ la fin de la fermentation ni dans des expériences de laboratoire, ni dans la préparation de cultures pures à l'usage de la grande industrie. Comme nous le verrons plus tard, il y a en effet relativement un grand nombre de cellules qui ne se développent pas lorsqu'on prend la levûre à la fin de la fermentation, de même aussi que la levûre de bière dont on voudrait faire une culture pure n'est alors, en général, pas prédominante dans la levûre impure des brasseries. On est ainsi amené précisément à prendre pour point de départ le commencement de la fermentation, c'est-à-dire à opérer dans les conditions les moins favorables à la culture sur plaques.

---

## III.

## Quelques recherches secondaires qui se sont présentées pendant la préparation de ce mémoire.

Je mentionnerai encore dans ce mémoire deux questions qui se rattachent plus ou moins à ce qui précède. La première est celle-ci: comment varie le nombre des cellules capables de se développer dans la gélatine mélangée de moût de bière, suivant que la levûre qu'on emploie pour la culture pure est prise au commencement ou à la fin de la fermentation? La seconde est relative à l'action des différentes gélatines nourricières sur les levûres: Y a-t-il relativement un plus grand nombre de cellules qui se développent, et ces cellules produisent-elles de plus grandes colonies dans la gélatine mélangée de moût de bière que dans les autres gélatines nourricières ordinairement employées, ou quel est le rapport?

Nous examinerons de plus près la première question. C'est un fait connu que les gélatines, en comparaison avec les liquides, sont dans beaucoup de cas des substratum plus mauvais, surtout vis-à-vis des bactéries et des cellules de levûre qui, par une raison ou une autre, sont affaiblies. Ce fait a été souvent signalé, par exemple par M. Miquel, dans le mémoire cité plus haut (Annuaire de Montsouris, 1888), de même qu'il a été constaté au laboratoire de Carlsberg pour la gélatine mélangée de moût, notamment en ce qui concerne les cellules de levûre. De vieilles cellules desséchées de Saccharomyces qui avaient été conservées près d'un an dans du papier à filtrer, ont fait fermenter le moût plus rapidement que les cellules correspondantes n'ont développé des taches sur la gélatine mélangée de moût; de la

même manière se sont comportées des cellules de Sacch. apiculatus qui avaient passé 3 ans dans la terre (E. Chr. Hansen: Nouvelles recherches sur la circulation du Sacch. apiculatus dans la nature, Annales des Sciences naturelles. Botanique. T. XI no. 3, 1890, p. 185, et Annales de Micrographie. Tome III, Paris 1890, p. 76) et ont ensuite été semées partie dans du moût, partie dans de la gélatine mélangée de moût, car les premières ont produit en abondance des cellules de cette espèce, tandis que les secondes ne se sont pas du tout développées. Les inconvénients de la gélatine se manifestent également lorsque, au lieu d'opérer avec des cultures pures, comme dans le cas ci-dessus mentionné, on opère avec des mélanges de cellules de levûre, de bactéries et de moisissures; en effet les cellules affaiblies de la levûre, qui, dans le moût, ont besoin de rester pendant près de 14 jours exposées à la température de 25° C. pour reprendre des forces et donner des signes de vie (fermentation et développement), ne peuvent pas du tout se développer dans la gélatine, parce que celle-ci ne peut se conserver si longtemqs sans que les moisissures la couvrent de leurs végétations ou que les bactéries la fassent couler.

Il suit de là qu'on doit s'attendre à trouver quelque différence entre le nombre des cellules qui se développent dans la gélatine, lorsque la semence est prise au commencement de la fermentation, alors que les cellules sont jeunes et vigoureuses, et qu'elle provient des cellules vieilles et bien souvent affaiblies de la fin de la fermentation. Mes recherches m'ont à cet égard fourni les renseignements suivants. J'ai opéré avec de la gélatine mélangée de moût et poursuivi ma culture pendant 2 jours à la température de 22° C. environ.

**A. Du commencement de la fermentation.**

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Dans le no. | 4 | il ne s'est pas développé | 2,3 % | des cellules. |
| — | - 8 | — | 6,4 - | — |
| — | - 9 | — | 10,4 - | — |
| — | - 10 | — | 3,3 - | — |
| — | - 11 | — | 9,8 - | — |
| — | - 12 | — | 5,5 - | — |
| — | - 13 | — | 2,8 - | — |
| — | - 15 | — | 4,0 - | — |
| — | - 17 | — | 7,8 - | — |
| — | - 18 | — | 0,0 - | — |
| — | - 19 | — | 3,6 - | — |
| — | - 21 | — | 2,6 - | — |
| — | - 23 | — | 0,0 - | — |

On se rappellera que j'ai employé dans ces expériences différentes espèces de levûres, en partie isolées, en partie mélangées.

Au commencement de la fermentation, comme le montre le tableau, il n'y a relativement qu'un petit nombre de cellules qui ne se sont pas développées dans la gélatine; dans deux cas, ce nombre est nul, c'est-à-dire que toutes les cellules ont produit des colonies, et le nombre maximum des cellules non développées a été de 10,4 %. Pour la moyenne des 13 expériences, nous trouvons 4,5 %.

**B. De la fin de la fermentation.**

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Dans le no. | 1 | il ne s'est pas développé | 22,0 % | des cellules |
| — | - 2 | — | 24,4 - | — |
| — | - 3 | — | 16,0 - | — |
| — | - 5 | — | 32,8 - | — |
| — | - 6 | — | 29,8 - | — |
| — | - 7 | — | 43,3 - | — |
| — | - 14 | — | 11,5 - | — |
| — | - 16 | — | 24,5 - | — |

Comme le montre le tableau, il y a toujours, à la fin de la fermentation, un nombre relativement considérable de cellules qui, dans les conditions que nous avons décrites, ne se développent pas dans la gélatine. Ce nombre varie ici entre 11,5 et 43,3 %, et la moyenne des 8 expériences est de 25,5 %. La mauvaise influence de la gélatine sur les Saccharomyces et les cellules analogues déjà affaiblis apparaît donc ici bien clairement; cependant la gélatine mélangée de moût de bière est plus favorable que la plupart de celles qu'on emploie ordinairement, peut-être à l'exception de la gélatine mélangée d'eau de levûre et de 10 % de dextrose.

Nous arrivons maintenant à la seconde question qui avait aussi attiré mon attention pendant la préparation de mon mémoire, à savoir quelle est la meilleure gélatine nourricière pour les cellules de levûre. Au total, les expériences que j'ai faites à ce sujet (voir le texte danois) parlent en faveur de la gélatine mélangée de moût: de grandes colonies, un rapide et riche développement, tels sont les avantages qu'on obtient en employant ce substratum.

Avant de terminer, encore une petite observation et une remarque qui s'y rattache. De même que, de la forme parfaitement ronde et de la situation isolée des colonies dans la couche de gélatine, nous ne pouvons pas conclure — ce que le résultat principal de ces recherches nous a déjà appris — qu'une pareille colonie représente une culture

pure et n'est pas formée par deux ou plusieurs cellules, de même ce qui, sous le microscope, se présente en apparence sous la forme de deux colonies en partie fusionnées, peut inversement être issu d'une seule colonie, d'une seule cellule comme point de départ. J'ai observé une fois ce cas dans l'expérience n°. 2 avec la levûre basse n°. 1 de Carlsberg. La cellule marquée avec le marqueur était isolée dans l'anneau. Au bout d'un jour, elle avait formé une colonie parfaitement ronde, et le phénomène ci-dessus mentionné ne se manifesta que le second jour. Quelques cellules avaient probablement percé la couche de gélatine, et formé au-dessus une colonie plus grande et excentrique par rapport à la colonie plus petite placée au-dessus.

---

## IV.

## Aperçu général.

En terminant, je donnerai un court aperçu des points de vue sous lesquels j'ai envisagé mes recherches, et des principaux résultats que j'ai obtenus.

Mon mémoire comprend trois parties, d'abord un court exposé historique du développement des méthodes de cultures pures, puis la question principale, la limite des erreurs dans la méthode des cultures sur plaques de M. Koch, et enfin quelques questions secondaires qui se sont présentées dans le cours de ce travail et s'y rattachent plus ou moins.

Dans la première partie, j'ai montré que le principe sur lequel est basé le développement des méthodes de cultures pures, à savoir l'emploi de l'individu isolé comme point de départ, a de tout temps été reconnu le seul théoriquement, mais que, dans la pratique, il est loin d'avoir toujours été suivi. J'ai ensuite rappelé que les conditions qu'exigent les cultures pures sont différentes, suivant qu'il s'agit de recherches sur l'évolution et le morphologie des microorganismes ou de recherches physiologiques.

Parmi les botanistes qui ont traité la question au point de vue de l'évolution, j'ai d'abord cité Kützing (1851), qui s'est servi d'une méthode indiquée par Mitscherlich pour étudier le développement de la cellule de levûre; avant lui, Ehrenberg (1821), dans ses recherches sur différents champignons, a également pris l'individu comme point de départ pour étudier la germination des spores. Plus tard, Tulasne (1861) et notamment De

Bary (1866) ont suivi la même méthode dans leurs recherches sur la germination des spores des champignons et les premières phases de leur développement. Mais Brefeld (1875) a fait un pas de plus que ses devanciers, car il a en outre, par un examen microscopique direct, poursuivi jusqu'au bout l'évolution de ses champignons. Nous avons décrit en détail sa manière de procéder à l'aide de cultures sur des lames de verre porte-objet et de chambres humides, et fait remarquer que ses cultures ne se faisaient pas sans interruption sous le microscope, ce qui n'est pas non plus possible, lorsqu'il s'agit de suivre le développement d'un champignon supérieur, mais qu'il recourait de temps à autre à un contrôle pour pouvoir compléter par ses différentes observations tout le cycle du développement. Nous avons également fait observer que, dans ces circonstances, il n'est pas toujours possible d'opérer avec des cultures absolument pures, et que ce n'était d'ailleurs pas nécessaire dans des recherches sur l'évolution; on peut même bien se passer de cultures pures.

Il en est tout autrement lorsqu'il s'agit de recherches physiologiques et d'expériences avec des cultures en masse d'une seule espèce. Le contrôle direct sous le microscope est impossible, et il faut recourir à d'autres méthodes que les précédentes, qui ne peuvent pas du tout servir.

Les auteurs qui se sont occupés de ce genre de recherches ont fait usage soit de liquides, soit de substratum solides. Les liquides ont été employés aussi bien dans la méthode physiologigue de culture pure (entre autres par Pasteur), que dans la méthode dite de dilution ou de dissémination (Lister, Hansen), et les substratum solides, par Schroeter, Koch et son école et Hansen.

Pasteur (1876) et les auteurs qui ont employé la méthode physiologique pour la préparation des cultures pures, ont pris pour base de leurs recherches les différentes propriétés physiologiques des divers microorganismes, et notamment celle-ci, qu'ils peuvent, dans différents liquides, manifester une force de résistance plus ou moins grande. Comme nous l'avons vu, c'est un effet du hasard si l'on obtient ou non une cultnre pure par cette manière de procéder.

Lister (1878) est le premier qui ait fait usage de la méthode de dilution en l'appliquant à une bactérie de l'acide lactique. Son procédé a aussi été décrit en détail. Il s'agissait de déterminer sous le microscope le nombre des bactéries contenues dans une très minime quantité du liquide ($^{1}/_{50}$ de goutte), afin de pouvoir calculer combien d'eau stérilisée il fallait y ajouter pour qu'une certaine petite partie de ce liquide ne renfermât en moyenne qu'un seul germe. Mais une pareille méthode de dissémination n'est jamais

exacte, même si elle est combinée avec une numération. Il se présente en particulier les questions suivantes: comment peut-on savoir que le résultat a été réellement atteint? A-t-on un moyen pour distinguer les ballons qui n'ont été infectés que par une seule cellule de ceux qui, malgré le calcul, l'ont été par plusieurs? Ces questions ont été résolues par Hansen (1882), et c'est alors seulement que la méthode de dilution est devenue exacte. Les deux nouvelles contributions apportées par Hansen sont, d'une part, une numération exacte et, de l'autre, la découverte d'un signe qui permet de décider si les ballons, après l'infection, ont reçu une ou plusieurs cellules; les ballons qui présentent une seule tache de levûre sont les seuls qui renferment avec certitude une culture pure. Mais cette méthode n'est pas applicable aux bactéries, et on l'emploie seulement pour les cellules de levûre; c'est par elle que Hansen a préparé ses premières cultures pures. Les méthodes de dilution avec un liquide sont en général rarement employées aujourd'hui, après que s'est répandu l'usage des méthodes avec la gélatine.

Si maintenant nous passons aux auteurs qui ont employé un substratum solide, nous rencontrons d'abord Schroeter (1872), qui pour la culture pure des bactéries à pigment, a fait usage de tranches de pommes de terre; mais celui qui, à vrai dire, a développé cette méthode, c'est Robert Koch (1881). Le premier procédé dont il s'est servi, en répartissant les germes dans des raies tracées sur la gélatine solide, était cependant très imparfait. Koch l'a aussi remplacé plus tard par la méthode des cultures sur plaques (1883), dans laquelle les germes sont répartis par des secousses dans la gélatine encore fluide. Elle repose en réalité sur le même principe qui était appliqué dans la méthode de Lister avec un liquide nourricier. Mais en ce qui concerne un grand nombre de bactéries, il n'est guère possible de s'assurer un point de départ; il y a très certainement une probabilité en faveur d'une culture pure, mais la certitude manque. On l'obtient seulement lorsque, dès l'origine, après la répartition des germes dans la gélatine, on observe un germe isolé et en suit le développement jusqu'à ce qu'il ait formé une colonie facile à reconnaître à l'oeil nu.

C'est ce que Hansen a fait pour les cellules de levûre (1883) en portant, après la répartition des cellules dans la gélatine, une partie de celle-ci dans une chambre humide, où il peut observer les différentes cellules, en marquer la place, en suivre le développement et choisir la tache végétative dont il se sert plus tard pour préparer une culture en masse.

Tel est en peu de mots le contenu de la première partie du mémoire. On voit par là comment les botanistes ont toujours maintenu

le principe d'une cellule comme point de départ, tandis que, parmi les physiologues qui se sont occupés de cette branche de la technique baetériologique, Hansen est le seul qui, dans la pratique, ait rigoureusement établi ce principe. Dans les dernières années, plusieurs auteurs, de plus en plus nombreux, ont suivi son exemple. La notion de culture pure n'est en réalité qu'un moyen technique assurément très précieux, mais pas davantage, et c'est seulement par l'usage qu'on en fait et par les résultats qu'on en obtient, lorsqu'ils sont employés au service de la science, qu'elle acquiert une plus grande valeur.

Nous arrivons maintenant à la deuxième partie du mémoire, à savoir les recherches sur la limite des erreurs dans la méthode des cultures sur plaques de Koch. Que la méthode de Hansen, à l'aide d'une chambre humide, soit théoriquement à préférer, cela est évident; mais en fait d'expériences pratiques pouvant démontrer la nécessité de son emploi, il n'y avait jusqu'ici que celle mentionnée plus haut, et tel est le motif qui m'a fait soumettre la question à un nouvel examen. Par les raisons déjà citées, j'ai seulement employé dans mes recherches des cellules de levûre et laissé de côté les bactéries. J'ai opéré sur plusieurs espèces de levûres, tantôt isolées et tantôt mélangées. Dans quelques cas, la levûre a été prise au début de la fermentation, dans d'autres, au contraire, à la fin.

Mes expériences ont été faites à l'aide de chambres humides et d'après le même principe que dans la méthode de culture pure de Hansen mentionnée plus haut. J'ai seulement compté comme des erreurs les cas où, en examinant les chambres humides au bout de 2 jours, j'ai trouvé que deux ou plusieurs cellules avaient formé une seule colonie qui ne présentait pas trace d'une fusion de deux ou plusieurs taches, mais semblait au contraire pouvoir être issue d'une seule cellule. J'ai ainsi, dans mes calculs des erreurs que la méthode des cultures sur plaques peut occasionner, trouvé en centièmes un nombre plutôt trop petit que trop grand.

J'ai fait en tout 23 séries d'expériences dont voici le résultat. En appliquant la méthode de Koch à des cellules de levûre, j'ai seulement dans 1 de mes 23 séries obtenu des cultures complètement pures — dans ce cas, 100 colonies étaient formées par 100 cellules — mais cela ne s'est reproduit dans aucune des autres. L'erreur maximum est celle que j'ai observée dans l'expérience où 100 colonies ont été formées par 125 cellules, et en prenant la moyenne de toutes les expériences, on trouve pour résultat 100 colonies formées par 108 cellules.

J'ài constaté dans plusieurs expériences que les cellules provenant d'une levûre prise au commencement de la fermentation étaient plus difficiles à séparer les unes des autres dans la gélatine que des cellules de la même espèce prises à la fin de la fermentation. En prenant ainsi la moyenne des expériences faites avec de la levûre du commencement de la fermentation, on trouve que 100 colonies sont formées par 110 cellules, tandis que la moyenne des expériences faites avec de la levûre de la fin de la fermentation donne 100 colonies formées par 107 cellules. On peut donc en conclure que l'erreur commise dans l'emploi de la méthode des cultures sur plaques, est moindre lorsque les cellules proviennent de la fin de la fermentation que lorsqu'elles sont prises au commencement de celle-ci.

Comme il a été dit plus haut, j'ai à dessein limité mes recherches aux cellules de levûre et n'ai pas traité la question au point de vue des bactéries, la méthode de Koch étant ici la meilleure dans la plupart des cas. Il est du reste superflu de rappeler la grande importance que les travaux du célèbre savant allemand ont eue pour la bactériologie.

La troisième partie du mémoire traite des deux questions suivantes: comment varie le nombre des cellules aptes à se développer dans la gélatine mélangée de moût de bière, suivant que la levûre dont on se sert pour la culture pure provient du commencement ou de la fin de la fermentation, et quelle est la gélatine nourricière qui convient le mieux aux cellules de levûre. Relativement à la première, j'ai trouvé que, dans deux séries d'expériences faites avec de la levûre du début de la fermentation, toutes les cellules marquées ont produit des colonies, et que la moyenne des cellules qui ne produisaient pas de colonies était de 4,5 % pour la levûre du commencement de la fermentation et de 25,5 % pour celle de la fin de la fermentation. Quant à la seconde question, j'ai trouvé que la gélatine mélangée de moût de bière est en somme celle qui donne les meilleurs résultats.

# Qu'est ce que la levûre pure de M. Pasteur?

## Une recherche expérimentale

par

**Emil Chr. Hansen.**

---

I.

Dans les recherches que j'ai faites, dans les années 1879 et 1880, sur le Sacch. apiculatus, je préparais encore mes cultures pures d'après les principes qui sont exposés dans les „Etudes sur la bière“ de M. Pasteur. Voici la description que j'ai alors donnée de mon procédé[1]: „Dans un grand nombre de flacons avec du moût stérilisé comme liquide nourricier, on introduit des fruits sur lesquels il y a lieu de supposer que le Sacch. apiculatus se trouve, mais seulement un fruit dans chaque flacon, et on s'assure en outre que la surface n'en est pas couverte de moisissures ni trop impure, ce que l'œil, avec un peu d'exercice, découvre rapidement. Au bout de quelques jours, un ou plusieurs de ces flacons renfermeront en général une végétation abondante et assez pure de notre organisme. Peu importe que quelques bactéries y soient mêlées, car d'ordinaire on s'en débarrasse assez facilement par des cultures dans des liquides acides. Mais cela devient plus difficile lorsqu'avec le Sacch. apiculatus apparaissent d'autres espèces de Saccharomyces ou des moisissures. En pareil cas, le mieux sera d'arrêter l'expérience et de recommencer. Mais, si la culture ainsi obtenue peut servir, on en infecte du moût stérilisé, additionné d'un peu d'acide tartrique, dans un ballon à deux

---

[1]) Emil Chr. Hansen: Sur le Sacch. apiculatus et sa circulation dans la nature. Compte rendu des travaux du laborat. de Carlsberg. I Vol. 3e Liv., Copenhague 1881, p. 173.

cols semblable à ceux qu'emploie M. Pasteur. Au bout de quelques jours, la fermentation est en pleine activité, et l'on sépare alors par décantation le liquide nourricier du ferment, qui reste au fond du ballon, après quoi on ajoute du liquide frais de la même composition, en prenant les précautions nécessaires pour qu'il ne s'y introduise pas des organismes du dehors. En répétant plusieurs fois cette opération, on arrive à la fin à obtenir une culture parfaitement pure". Je pouvais, malgré l'imperfection de la méthode, m'exprimer avec une pareille certitude, parce que l'espèce dont il s'agit présente, sous plusieurs rapports, des signes très caractéristiques. C'est en effet une des levûres peu nombreuses que, grâce à la forme particulière des cellules, nous pouvons déterminer avec l'aide seul du miscroscope, à quoi il faut ajouter qu'elle se distingue aussi à plusieurs égards au point de vue physiologique. Lorsqu'on opère avec cette espèce, on peut en un mot, à chaque moment de l'expérience, procéder à un contrôle qui permet de décider si l'on a affaire ou non à une culture pure. Mais rien de tout cela n'est applicable aux cellules de levûre à spores endogènes, aux véritables Saccharomyces (deux espèces récemment découvertes font seules exception), et c'étaient précisément ces espèces que je désirais soumettre à une étude approfondie, à cause de leur grande inportance théorique et pratique. Dans ce domaine, il n'était pas possible d'aller plus loin en suivant les voies tracées par mes devanciers. Pour pouvoir aborder la tâche que je m'étais proposée, je devais donc tout d'abord créer une méthode exacte pour la préparation des cultures pures dont j'avais besoin. J'ai ainsi, à vrai dire contre mon gré, été forcé, pendant des années, de faire des recherches sur cette branche de la technique bactériologique, et c'est seulement après les avoir menées à bonne fin, que j'ai pu attaquer les problèmes qui, pour moi, étaient la chose principale[1]).

---

[1]) Dans les recherches dont il est parlé ci-dessus, je suis parti du principe que, pour obtenir avec certitude une culture pure, il faut prendre pour point de départ une seule cellule. La première méthode que j'ai élaborée était une méthode de dilution avec des liquides stérilisés. La levûre était délayée dans de l'eau, et on en introduisait ensuite des portions exactement mesurées dans des ballons renfermant du moût. A l'aide d'un compteur, je faisais l'ensemencement de manière que seulement un nombre déterminé et assez petit de ces ballons étaient infectés. Ce qu'il y avait de nouveau dans ma méthode, consistait surtout dans ma découverte d'un signe qui me permettait de distinguer les ballons qui avaient reçu chacun une seule cellule de ceux qui, malgré mon compte, en avaient reçu plusieurs; j'avais en effet observé que les cellules de levûre, après avoir été par des secousses bien réparties dans le moût, se fixaient à la paroi inférieure du ballon en y formant chacune une

Dans mes premiers mémoires sur les levûres, je me suis borné à communiquer les résultats nouveaux que j'avais obtenus, et je ne me doutais pas alors qu'il pût devenir nécessaire de signaler les erreurs de mes devanciers, et de faire clairement ressortir en quoi consistaient les progrès dus à mes travaux. Par l'accueil qu'ils leur ont fait, mes adversaires m'ont appris que ce n'est pas ainsi que j'aurais dû m'y prendre pour faire accepter ma réforme. Cela m'a encore été rappelé dans les dernières années par les attaques qui ont été dirigées contre moi en France, surtout par MM. Duclaux et Velten.

M. Duclaux essaie de prouver que les méthodes qui, il y a 14 ans, ont été données par M. Pasteur, dans l'ouvrage ci-dessus mentionné, pour préparer des cultures pures de cellules de levûre, sont satisfaisantes[1]). Il insiste surtout sur le procédé qui consiste à cultiver la levûre sur laquelle on opère dans une solution de saccharose à 10 % additionnée d'un peu d'acide tartrique. Pour démontrer la vérité de son assertion, il a examiné quelques-uns des anciens ballons de M. Pasteur qui contenaient des végétations de

---

tache végétative. J'ai, par cette méthode, obtenu les cultures pures des six espèces de Saccharomyces que j'ai fait connaître en 1883, et de plusieurs levûres des brasseries. Ma première communication à ce sujet a paru en février 1882 dans le „Compte rendu des travaux du laborat. de Carlsberg". I Vol. 4e Liv. p. 206 et 212, et une autre plus détaillée a été publiée dans le même ouvrage II Vol. 2e Liv. p. 23.

Quand plus tard la gélatine, à la suite des travaux de M. Koch, en vint à jouer un rôle important dans la pratique de la bactériologie, je fis aussi usage de ce substratum en employant comme auparavant le moût de bière pour liquide nourricier. Mais je constatai que les cellules ne se laissent pas disséminer dans la gélatine fluide avec la même certitude que dans l'eau et le moût; plusieurs des taches développées dans la gélatine ne sont par suite pas formées par une seule cellule, mais par plusieurs, et on n'a par conséquent aucune certitude qu'elles contiennent une culture pure. Je recommandai alors l'emploi de la chambre humide dans ce genre de cultures pures et, à la différence de M. Koch, insistai sur la nécessité de prendre, également dans ce cas, une seule cellule pour point de départ (Compte rendu des travaux du laborat. de Carlsberg, II Vol. 2e Liv. p. 27 et II Vol. 4e Liv. p. 94. Voir aussi le mémoire de M. Holm: „Sur les méthodes de culture pure, et spécialement sur la culture sur plaques de M. Koch et la limite des erreurs de cette méthode", Compte rendu des travaux du laborat. de Carlsberg, III Vol. 1e Liv. 1891, p. 1). Mon procédé exact ne présente pas de difficultés spéciales en ce qui concerne les cellules de levûre; par contre, il semble que, dans un grand nombre de cas, il ne puisse encore être appliqué aux bactéries.

[1]) E. Duclaux. Sur la conservation des levûres (Annales de l'institut Pasteur, 1889, p. 375).

levûres, partie dans du moût de bière, partie dans la solution précitée de saccharose avec de l'acide tartrique, et qui étaient restés dans le laboratoire de M. Pasteur depuis que ce dernier, en 1876, avait renoncé à poursuivre ces études; plusieurs même dataient de 17 ans. En examinant 19 de ces ballons, M. Duclaux en a trouvé 14 qui renfermaient des cultures pures; il n'est pas tout à fait sûr qu'il en soit de même de 3 des autres, mais suppose cependant qu'ils ne renfermaient chacun qu'une espèce; quant aux 2 derniers, qui contenaient des levûres de brasserie, il nous apprend qu'il y avait dans chacun deux espèces. De là il conclut que ces vieux ballons ont prouvé que la méthode de culture pure dont il s'agit est exacte. Si tel était le cas, j'aurais commis une grande erreur et perdu mon temps dans des travaux inutiles.

Contre l'argumentation de M. Duclaux, MM. Miquel (Annales de Micrographie, 1889, p. 140), A. Jørgensen (Botan. Centralblatt, XL Bd. 1889, p. 316) et Denamur (La Gazette du Brasseur, 1889, p. 887) ont aussitôt soulevé la même forte objection, à savoir qu'il est impossible, après un si long espace de temps, de savoir avec quelque certitude quelles sont les végétations que M. Pasteur a semées dans ces vieux ballons. Des ballons qui ne renferment maintenant qu'une seule espèce peuvent très bien, à l'origine, en avoir renfermé plusieurs; nous ne sommes, en un mot, pas en état de découvrir les espèces qui peut-être sont mortes dans le cours de ces 14 et 17 années. Si M. Duclaux désirait de faire revivre les vieilles méthodes de M. Pasteur, il aurait plutôt dû nous montrer par des recherches théoriques et pratiques ce que ces méthodes peuvent réellement nous donner. Son examen des vieux ballons ne fournit en réalité aucun renseignement à ce sujet. Je me propose, dans ce qui suit, de communiquer d'abord une recherche théorique sur la portée de la méthode, et puis de montrer par des expériences ce qu'on en peut obtenir.

Le travail auquel s'est livré M. Duclaux nous apprend que plusieurs espèces peuvent vivre ensemble en paix dans le même ballon pendant un espace de 15—17 ans. Dans ces circonstances, il ne saurait, cela va sans dire, être question de culture pure, et nous avons donc un cas où la méthode fait défaut. De mon côté, je concède volontiers à mon adversaire qu'il y a des levûres qui ont une vitalité différente dans le milieu donné, et que, s'il se trouve dans un ballon un mélange de pareilles espèces, il arrivera naturellement un moment où les plus faibles périront, et il ne restera que l'espèce la plus forte. Mais maintenant se pose cette question: à quoi peut-on reconnaître que ce moment est venu, et quel signe a-t-on qui permette

de décider avec certitude si le ballon renferme une ou plusieurs espèces? Si la méthode était exacte, elle devrait pouvoir y répondre, mais ni M. Pasteur, ni M. Duclaux ne donnent de renseignement à cet égard. On peut donc dire que la méthode est par cela seul très incertaine et que, en l'employant, on travaille en réalité plus ou moins au hasard et en aveugle.

En examinant de plus près l'ouvrage cité de M. Pasteur, p. 224—228, nous trouvons qu'il a lui-même reconnu des limites et qu'il s'est lui-même rendu compte que, par les voies qu'il suivait alors, on ne pouvait obtenir qu'une certitude conditionnelle. C'est pourquoi il n'emploie pas non plus une méthode déterminée, mais plusieurs, pour obtenir une culture pure, et dit qu'on doit, suivant les cas, se servir tantôt de l'une, tantôt de l'autre, et en général aller en tâtonnant; de règle fixe, il n'en donne pas. Après avoir décrit les différentes manières dont on peut procéder, il s'exprime comme il suit: „Par ces divers artifices, employés isolément ou combinés les uns avec les autres, on arrive généralement à obtenir très-pure la levûre qu'on désire purifier". De culture pure telle que nous l'entendons aujourd'hui, il n'en est donc pas du tout question. En décrivant les expériences qu'il a faites sur les ferments alcooliques, il dit même dans plusieurs endroits de son ouvrage, par exemple p. 179 et dans la note p. 205, qu'il ne lui a pas été possible de décider s'il avait une ou plusieurs espèces dans chacun de ses ballons. M. Pasteur cherche à atteindre son but en favorisant autant que possible, dans une série de cultures, l'organisme qu'il désire isoler, en même temps qu'il cherche à arrêter le développement de celui ou de ceux qu'il veut écarter. De cette façon on peut naturellement supprimer les espèces qui, dans le milieu nourricier donné, ne sont pas capables de soutenir la concurrence contre l'espèce favorisée. Mais, à côté de cette dernière, il peut bien en vivre toute une bande, à savoir toutes celles qui ont à peu près les mêmes conditions d'existence. Les principes de cette espèce de culture pure sont d'une nature purement physiologique, et présupposent, à vrai dire, qu'on connaît à l'avance les particularités des espèces sur lesquelles on opère; mais comme, dans la plupart des cas où nous avons à faire une culture pure, nous nous trouvons précisément en face de grandeurs inconnues, il est évident que des procédés de cette nature ne donnent en général aucune certitude. Ils peuvent seulement être employés dans les cas rares où les espèces avec lesquelles on a affaire présentent des caractères si distincts qu'il n'est pas facile de les confondre avec d'autres, et où un contrôle est possible. J'en ai donné un exemple au commencement de ce mémoire en parlant de mes études sur le Sacch. apiculatus.

Après avoir publié dans les Annales de l'institut Pasteur le mémoire mentionné plus haut, M. Duclaux a de nouveau traité ces questions dans quelques discours qu'il a prononcés au congrès des brasseurs français, à Paris, en 1889 (Le génie civil, p. 110), et au congrès de Lille, en 1890 (La Gazette du Brasseur, p. 447, n°. 141, 1890). Il y reconnaît que ma méthode marque un véritable progrès, et que mes travaux ont produit une réforme dans la fermentation des brasseries. Sur ce dernier point cependant, il limite ses concessions à la fermentation basse, et se prononce encore pour l'introduction dans les brasseries à fermentation haute des vieilles méthodes de M. Pasteur. Ces discours sont publiés dans des revues qui ne sont lues que dans un cercle restreint, et la plupart ne connaissent par suite son opinion sur les questions de cultures pures que par le mémoire qui a paru dans les Annales de l'Institut Pasteur. Si mon célèbre collègue les avait aussi fait paraître dans cette dernière revue, je me serais peut-être dispensé de m'occuper encore de cette vieille affaire, bien qu'ils renferment aussi plusieurs assertions inexactes.

Quant à la question de savoir si ma méthode peut être employée ou non dans les brasseries à fermentation haute, elle a été résolue affirmativement, en Danemark, par les essais de M. Alfred Jørgensen; en Australie, par ceux de M. De Bavay, et récemment, dans le nord de la France et en Belgique, par ceux de MM. Kokosinski, Van Laer et Vuylsteke (Station scientifique de brasserie, Comptes-rendus. Gand, 1890, p. 13—21. La Gazette du Brasseur, Bruxelles 1890).

En France même, ma méthode, d'après la communication de M. Kokosinski dans la première des revues ci-dessus citées, a été introduite avec succès dans 15 brasseries à fermentation haute. Son emploi n'est donc pas, comme le croit M. Duclaux, limité aux brasseries à fermentation basse.

---

M. Velten a commencé ses attaques contre moi dans les conférences qu'il a faites à l'exposition française des brasseries, à Paris, en 1887 (Revue universelle de la brasserie et malterie, 1888, no. 742 et 743), et les a renouvelées au congrès d'Anvers, en 1889 (voir à ce sujet le compte-rendu du congrès p. 82). Il prétend que je me suis complètement trompé en introduisant dans l'exploitation des brasseries un levain composé d'une seule espèce ou race, car il est d'avis que le levain des brasseries doit au contraire se composer de plusieurs espèces de levûres, et s'exprime à ce sujet comme il suit: „C'est l'ensemble de ces ferments, de race et de nature différentes, vivant et se développant dans le même milieu, qui concourent à donner

à la bière le goût et le bouquet que l'on désire". Ce résultat, on l'obtient, suivant lui, par le procédé de M. Pasteur, en cultivant la levûre dans une solution de sucre de canne additionnée d'un peu d'acide tartrique, ou dans du moût mélangé d'acide phénique et d'alcool. Il ne donne pas de description plus détaillée du procédé dans les conférences ci-dessus mentionnées; mais, en remontant plus haut, nous en trouvons une dans la conférence qu'il a faite à l'exposition universelle de Paris, en 1878, et publiée plus tard sous le titre suivant: De la fabrication de la bière par le procédé Pasteur. Conférence faite par Eugène Velten au Congrès international des brasseurs de Paris, en 1878 (Revue universelle de la brasserie, Paris 1881, nº. 372). On la trouve également dans la brochure publiée par le congrès. Il y dit: „Si, dans un liquide sucré, favorable au développement du ferment alcoolique, on ajoute un acide, on gêne, par cette acidité, le développement des ferments de maladie. Le ferment acétique peut, il est vrai, vivre dans un milieu acide, mais il a besoin, pour se former, d'une température élevée. — Quant aux autres ferments de maladie, ils ne vivent pas dans un liquide acidulé. On peut employer 4 à 5 pc. d'acide pour la purification du levain. Après quatre ou cinq opérations de ce genre, on a assurément des ferments purs; les ferments alcooliques, qui sont les plus énergiques et les plus nombreux, sont les seuls qui aient résisté". M. Pasteur emploie, dit-il, 4 cultures de ce genre, qui durent chacune 48 heures. D'après ce qui précède, il s'agit de purifier la levûre seulement par la suppression des bactéries, et le levain ainsi purifié se compose de plusieurs ferments alcooliques.

Peu après que M. Pasteur eut publié, en 1876, ses célèbres „Etudes sur la bière", feu le capitaine J. C. Jacobsen, au vieux Carlsberg, et M. Carl Jacobsen, au nouveau Carlsberg, essayèrent les procédés qui y sont indiqués pour la purification du levain des brasseries, y compris ceux où interviennent l'acide tartrique et l'acide phénique, mais ils n'en obtinrent pas un bon résultat et les abandonnèrent complètement. Il en a été de même dans celles des brasseries de l'étranger qui ont fait des essais analogues. Même en France, les procédés de M. Pasteur n'ont pu prendre racine dans la pratique. M. Velten est, pour le moment, le seul brasseur qui les recommande, et il ne les a, en tout cas, pas toujours suivis, comme cela résulte de ses propres communications (Wochenschrift für Brauerei, Berlin 1886, p. 5).

En sa qualité d'ancien collaborateur de M. Pasteur dans le domaine de la brasserie, M. Velten a un nom très connu, ce qui a donné à ses attaques, quelque mal fondées qu'elles fussent, un certain

poids. Ni lui, ni mes autres adversaires en France n'ont réussi à faire adopter par les brasseries les vieilles méthodes de M. Pasteur; mais ils ont, en plusieurs endroits, excité la défiance contre moi et ma réforme et, par là, été cause qu'elle a pénétré en France bien plus lentement qu'elle ne l'eût fait sans cela.

Lorsque, il y a huit ans, j'ai publié mes premiers mémoires sur la préparation des cultures absolument pures, j'avais pendant longtemps fait de nombreuses expériences avec les méthodes de M. Pasteur, mais je m'étais borné à en donner un court compte rendu théorique, pensant que cela suffirait. Les attaques dont j'ai été l'objet m'ont montré quelle était mon erreur. Me voyant donc forcé de m'occuper de nouveau de ces questions, j'ai compris tout de suite que, si je voulais en finir, je ne pouvais me contenter d'un compte rendu théorique, mais qu'il fallait y joindre des expériences nouvelles. J'ai été aidé dans ce travail par mes assistants, MM. Holm et Nielsen; M. Holm notamment a fait une grande partie des analyses.

Ces expériences forment deux groupes; le premier, qui comprend les quatre premières expériences, se rapporte surtout au côté théorique de la question; le second, auquel appartiennent la cinquième et la sixième expérience, a au contraire pour but de vérifier les assertions de M. Velten. Les deux groupes s'éclairent mutuellement.

---

## II.

### Première expérience.

Une solution aqueuse de saccharose à 10 %, à laquelle on avait ajouté 1/20 % d'acide tartrique, a été introduite dans des ballons Pasteur à deux cols et stérilisée. Après le refroidissement, ces ballons ont été infectés avec les levûres ci-contre, obtenues dans des cultures absolument pures. Les végétations employées provenaient d'une culture de 10 jours dans du moût de bière à la température du laboratoire[1]). Chaque ballon a reçu une quantité assez abon-

---

[1]) On trouvera une description des levûres mentionnées dans cette expérience et les suivantes dans mes mémoires antérieurs: „Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques" (Compte rendu des travaux du laborat. de Carlsberg 1883—1891) et „Untersuchungen aus der Praxis der Gährungsindustrie". Zweite Ausgabe. München 1890. Sur le mode de croissance de ces espèces à la surface de la gélatine,

dante de levûre et, de chaque espèce de levûre, une portion à peu près égale.

Dans A: Sacch. cerevisiæ I, Sacch. Pastorianus I, Sacch. Pastorianus III, Sacch. ellipsoideus II.

— B: Levûre basse no. 1 de Carlsberg, Sacch. Pastorianus I, Sacch. Pastorianus III, Sacch. ellipsoideus II.

— C: Levûre basse no. 1 et 2 de Carlsberg, Sacch. Pastorianus I et III, Sacch. ellipsoideus II.

Les ballons sont ensuite restés exposés à la température du laboratoire. Au bout d'un mois, ils ont été secoués et on y a pris un petit échantillon moyen qui a été introduit dans un autre ballon renfermant le même liquide, et où, un mois plus tard, il a été pris un nouvel échantillon moyen, avec lequel on a fait une culture semblable qui a encore été abandonnée à elle-même pendant un mois. Par ce transvasement d'échantillons moyens et ces cultures successives, les espèces qui devaient être prédominantes ont été encore plus favorisées, et on a ainsi préparé une culture pure.

Après que cette culture avait duré en tout 3 mois, il s'agissait de faire produire de nouvelles végétations par les cellules qui étaient encore vivantes, et ensuite de déterminer quelles étaient, dans chaque ballon de la dernière série, les espèces qui y vivaient encore. Dans ce but, on a de chaque ballon de cette série transvasé des échantillons moyens dans deux autres ballons, dont l'un renfermait du moût de bière et l'autre une solution de dextrose à 10 % dans l'eau de levûre; ces ballons ont ensuite été exposés à la température de 25° C., et dès qu'il s'y est développé une végétation, on en a pris des échantillons moyens qui ont été disséminés dans de la gélatine qu'on avait mélangée, d'une part, avec du moût et, de l'autre, avec la solution cidessus mentionnée de dextrose et d'eau de levûre. Les ballons contenant les restes de la végétation qui s'était développée dans le moût et la solution de dextrose, ont ensuite été exposés à la température du laboratoire jusqu'à la fin de la fermentation principale, après quoi on y a de nouveau pris des échantillons moyens qui ont été traités comme les précédents. Enfin, cette même culture par dissémination dans la gélatine a aussi été appliquée à des échantillons moyens pris directement des végétations qui, comme il a été dit plus haut, avaient

voir ma communication dans Centralblatt f. Bakteriologie und Parasitenkunde 1887, II Bd., p. 118. Les trois espèces sauvages, le Sacch. Pastorianus I, le Sacch. Pastorianus III et le Sacch. ellipsoideus II produisent des maladies dans la bière, et c'est justement pour cela qu'ils ont été choisis.

été cultivées pendant 3 mois dans la solution de sucre. Les expériences ont ainsi porté sur trois phases différentes du développement des végétations dont il s'agit. Les plaques de gélatine, avec les cellules qui y étaient semées, ont été exposées à la température de 25° C. jusqu'à ce qu'il s'y fût développé de nombreuses taches de végétation. Avec ces taches on a ensuite infecté un grand nombre de ballons qui renfermaient du moût de bière, et les taches elles-mêmes ont été soumises à un examen microscopique. Quant aux végétations qui se sont développées dans ces derniers ballons, on les a également examinées en vérifiant les caractères que je savais à l'avance devoir se trouver chez ces levûres. Il va sans dire qu'on a toujours employé des liquides et des gélatines stérilisés, et qu'on a pris les précautions nécessaires pour prévenir toute infection du dehors.

Le résultat a été que des 6 levûres qui, au commencement de l'expérience, avaient été semées dans les 3 ballons contenant une solution de saccharose et d'acide tartrique, il n'en restait que 2 de vivantes, à savoir le Sacch. ellipsoideus II et le Sacch. Pastorianus I; le premier s'etait maintenu dans tous les ballons, le second, seulement dans un ou peut-être dans deux. La présence de ce dernier n'a pu être constatée avec certitude que dans un des ballons, et seulement après la culture dans la solution de dextrose dans l'eau de levûre. Le Sacch. ellipsoideus II s'est donc montré le plus vigoureux dans les cultures ci-dessus décrites, mais même en ce qui concerne cette espèce, nous n'avons pas non plus la certitude d'avoir obtenu par cette méthode une culture pure.

### Deuxième expérience.

Elle a été faite comme la précédente, mais tandis que, dans celle-ci, la levûre provenait de cultures âgées de 10 jours, on a employé ici de toutes jeunes végétations obtenues par une culture qui n'a duré qu'un jour dans du moût à 25 C. La marche suivie a d'ailleurs été la même, et le résultat final a aussi été le même.

### Troisième expérience.

Les levûres employées, à savoir la levûre basse no. 1 de Carlsberg, le Sacch. cerevisiæ I et le Sacch. Pastorianus III, n'ont été semées que dans un seul ballon au lieu de 3, et la marche suivie dans les deux expériences précédentes a été modifiée en ce sens, que la culture dans la solution de sucre de canne et d'acide tartrique n'a

3

duré que 4 semaines, et que, pendant ce temps, on a fait, de la manière ci-dessus décrite, 4 cultures à des intervalles à peu près égaux. En recherchant ensuite quelles étaient les espèces encore vivantes, on en a trouvé deux, le Sacch. cerevisiae I et le Sacch. Pastorianus III. Le premier s'est montré notamment dans une culture au moût de bière, tandis que le second n'a apparu distinctement qu'après une culture dans une solution de dextrose et d'eau de levûre. Dans ce cas, on n'a donc pas non plus obtenu une culture pure.

### Quatrième expérience.

La culture dans la solution de saccharose et d'acide tartrique a, dans ce cas, duré 1 mois et, pendant ce temps, on n'a fait qu'un seul transvasement, à savoir après un repos de 14 jours. L'expérience a commencé avec 2 ballons dans chacun desquels on avait introduit les trois espèces suivantes: le Sacch. Pastorianus II, le Sacch. Pastorianus III et le Sacch. ellipsoideus II. Elles provenaient toutes de végétations vigoureuses, mais datant de 3 mois, produites sur une gélatine nourricière qui renfermait une décoction de poisson et de la saccharose. L'expérience a été conduite de la même manière que les précédentes. Quand elle a été terminée, il ne restait dans les deux ballons que le Sacch. ellipsoideus II.

Les méthodes de culture employées pour amener les espèces qui avaient survécu au traitement ci-dessus décrit dans la solution de sucre à développer des végétations, et à se faire ainsi reconnaître, sont de celles que, grâce à une expérience de plusieurs années, je sais être favorables à ces espèces.

Si j'avais mis en train un plus grand nombre de cultures en les variant de plusieurs manières, j'aurais sans doute eu la chance de faire apparaître au moins quelques-unes des espèces qui semblaient avoir péri. On ne saurait préciser où se trouve la limite à cet égard. Quelques-unes des taches, dans les cultures sur la gélatine, peuvent bien aussi avoir contenu chacune plus d'une espèce. En un mot, il est vraisemblable qu'il y a eu plus d'espèces vivantes qu'on n'en a trouvé. Les espèces observées doivent donc être celles qui étaient les plus nombreuses et les plus fortes. Mais même en admettant que les ballons où nous n'avons trouvé qu'une seule espèce vivante n'ont renfermé que celle-là, le résultat final n'en est pas moins que le procédé dont il s'agit ne nous donne pas la certitude d'obtenir une culture pure. De 9 ballons, 3 renfermaient chacun 2 espèces à la fin de l'expérience;

cependant deux des expériences ont été poursuivies pendant 3 mois. D'un autre côté, il n'est pas invraisemblable qu'en poussant encore plus loin, toutes les espèces sur lesquelles on opère mourraient à l'exception d'une seule; tel serait sans doute le cas du Sacch. ellipsoideus II dans les deux premières expériences. Mais il n'y a rien qui puisse nous guider sous ce rapport; nous n'avons aucun caractère qui nous permette de constater si nous avons ou non atteint la limite, et, en la dépassant, nous nous exposons à éteindre toute vie. En un mot, c'est travailler au hasard et ce ne sera jamais une méthode exacte.

La seule voie toujours sûre par laquelle nous puissions obtenir une culture pure d'un microorganisme, quelles qu'en soient d'ailleurs les propriétés physiologiques et morphologiques, c'est d'en semer une seule cellule dans un substratum nourricier stérilisé.

### Cinquième expérience.

Cette expérience et la suivante ont été faites pour vérifier le procédé que M. Velten a décrit dans la conférence mentionnée plus haut, et que, d'après l'indication de M. Pasteur, il emploie pour purifier la levûre des brasseries. Le liquide nourricier était dans ce cas une solution aqueuse de sucre de canne à 10 %, additionnée de 4 % d'acide tartrique. Les végétations sur lesquelles j'ai opéré se composaient de cellules jeunes et vigoureuses provenant d'une culture de 24 heures dans du moût de bière à 26 C., et des quantités égales de chaque espèce ont été introduites dans les ballons.

Dans A: Sacch. cerevisiæ I, Sacch. Pastorianus I, Sacch. Pastorianus III.

— B: Levûre basse no. 1 de Carlsberg, levûre basse no. 2 de Carlsberg, Sacch. Pastorianus I, Sacch. Pastorianus III.

— C: Levûre basse no. 1 de Carlsberg, levûre basse no. 2 de Carlsberg, Sacch. Pastorianus I, Sacch. Pastorianus III et Sacch. ellipsoideus II.

— D: Sacch. cerevisiæ I, Sacch. Pastorianus I, Sacch. Pastorianus III et Sacch. ellipsoideus II.

Après avoir reçu les mélanges ci-dessus, les ballons ont été exposés pendant 48 heures à la température du laboratoire, après quoi on les a fortement secoués et y a pris des échantillons moyens qui ont été transvasés dans de nouveaux ballons renfermant la même solution sucrée. On a fait ainsi, par des transvasements successifs, 4 cultures de A, de B, de C et de D, en abandonnant ensuite chacune d'elles à elle-même pendant 48 heures, ce qui, avec la première, porte à 5 en tout le nombre des cultures de chaque série. Comme on le

voit, le procédé est essentiellement le même que dans ma 1re expérience. Les ballons qui renfermaient la quatrième et la cinquième culture ont été examinés respectivement au bout de 8 et de 10 jours, à partir du commencement de l'expérience, et, dans ce but, après les avoir fortement secoués, on en a transvasé des échantillons moyens dans une série correspondante de ballons renfermant du moût de bière. On a ensuite laissé reposer les ballons qui avaient fourni les échantillons jusqu'à ce que la levûre qui y restait se fût précipitée, et décanté alors autant que possible tout le liquide en le remplaçant par une portion convenable de moût de bière. De cette manière, on n'a pas seulement opéré sur les échantillons moyens, mais les deux séries de ballons avec du moût en sont aussi venues à contenir, pour ainsi dire, toute la levûre qui se trouvait dans la culture correspondante dans la solution sucrée, et la dernière série de ces ballons n'a presque rien reçu du liquide fortement acide, circonstance qui a son importance quand il s'agit, comme ici, d'amener des cellules affaiblies à se développer. On a d'ailleurs toujours opéré avec des liquides stérilisés et veillé avec soin à ce qu'aucun organisme ne pénétrât du dehors dans les ballons.

Si ce traitement dans une solution de sucre de canne additionnée d'acide tartrique produisait réellement une purification de la levûre, ces ballons, avec des cultures dans du moût, devraient donc contenir les levûres de brasserie purifiées de tous les germes de maladie dont elles étaient mélangées à l'origine. D'après cela, nous devrions nous attendre à trouver dans les cultures de A et de D une végétation pure de la levûre haute de brasserie, le Sacch. cerevisiæ I, et dans les cultures de B et de C des végétations pures des levûres basses no. 1 et 2 de Carlsberg. Mais le résultat a été tout autre.

Les cultures dans le moût ont été placées dans un thermostat à 26° C., mais les ballons renfermant la levûre de A et de B et qui avaient été soumis pendant 8 jours au traitement dans la solution de sucre acidifiée, présentaient seuls des signes de développement; toutes les autres végétations devaient être considérées comme mortes, car au bout de 15 jours, on ne pouvait encore y découvrir aucun signe de vie. Les ballons avec des végétations vivantes présentaient des phénomènes manifestes de fermentation basse, et la bière avait le goût amer et l'odeur désagréable qui sont dus au Sacch. Pastorianus I. On en pouvait déjà conclure qu'ils ne pouvaient renfermer des cultures pures des levûres de brasserie semées à l'origine. Il s'agissait maintenant d'examiner de plus près en quoi consistaient ces végétations et, dans ce but, on a procédé à une dissémination et à un examen des cellules d'après le procédé décrit dans la première expérience. Le résultat a été qu'il n'y avait qu'une seule espèce, à savoir la

levûre de maladie Sacch. Pastorianus I; elle seule avait survécu au traitement dans la solution sucrée.

### Sixième expérience.

Tandis que, dans l'expérience précédente, il avait été semé des portions égales des différentes levûres, on n'a, dans celle-ci, mélangé les levûres de maladie avec les levûres de brasserie que dans la proportion de 1 : 5. Ces dernières avaient donc, dès l'origine, dans chaque ballon, une prépondérance absolue. L'expérience a été faite avec les 5 ballons suivants:

Dans A: Sacch. cerevisiæ I, Sacch. Pastorianus I.
— B: Une levûre basse de brasserie, Sacch. Pastorianus I.
— C: Levûre basse no. 2 de Carlsberg, Sacch. Pastorianus I.
— D: Sacch. cerevisiæ I, Sacch. ellipsoideus II.
— E: Une levûre basse de brasserie, Sacch. ellipsoideus II.

La solution de sucre ne renfermait cette fois que 3,8 % d'acide tartrique. La marche suivie est d'ailleurs la même que dans l'expérience précédente.

Les espèces du ballon D, le Sacch. cerevisiæ I et le Sacch. ellipsoideus II, étaient mortes après avoir été cultivées pendant 10 jours dans la solution sucrée; mais elles vivaient encore après le 8e jour, et, dans tous les autres ballons, une au moins des espèces a survécu à ce traitement, tant après le 8e qu'après le 10e jour.

Après avoir procédé à une dissémination des cellules et, pour chaque ballon, fait de ces cellules un grand nombre de cultures distinctes, dans quelques cas jusqu'à 80, on a, en opérant comme précédemment, obtenu les résultats suivants:

A: Les deux espèces semées étaient vivantes; mais, tandis que les cellules du Sacch. cerevisiæ I étaient, au commencement de l'expérience, 5 fois plus nombreuses que celles du Sacch. Pastorianus I, ce rapport était alors complètement interverti. La levûre de maladie avait en effet pris le dessus et refoulé à ce point la levûre de bière, qu'on n'a pu la découvrir qu'à l'aide de cultures spéciales dans du moût de bière, à 37—38° C., température qui est encore favorable au Sacch. cerevisiæ I, tandis qu'elle dépasse la température maximum que le Sacch. Pastorianus I peut supporter dans ces conditions.

B: On n'a trouvé que le Sacch. Pastorianus I; il ne restait pas trace de la levûre basse de brasserie.

C: Les cellules du Sacch. Pastorianus I étaient complètement prédominantes; il n'y avait que des traces douteuses de la levûre basse no. 2 de Carlsberg.

D: Le Sacch. ellipsoideus II a entièrement refoulé le Sacch. cerevisiæ I, qui, aussi dans ce cas, n'a pu être observé que dans une culture dans du moût à 37—38 ° C.

E: Les espèces semées, la levûre basse de brasserie et le Sacch. ellipsoideus II, ont été trouvées toutes les deux, mais ce dernier constituait alors la moitié du mélange, tandis qu'au commencement de l'expérience, il n'en formait que la cinquième partie; le ferment de maladie s'est donc, aussi dans ce cas, multiplié aux dépens de la levûre de brasserie.

Il résulte donc de cette expérience que les deux ferments de maladie, le Sacch. Pastorianus I et le Sacch. ellipsoideus II ont détruit plus ou moins complètement les levûres de brasserie. La première de ces levûres, comme nous l'avons déjà rappelé, donne à la bière un goût et une odeur désagréables, la seconde occasionne dans la bière de fermentation basse la maladie que nous appelons trouble de la levûre. Cela n'a donc servi de rien que les levûres de brasserie fussent prédominantes au commencement de l'expérience.

On se rappelle que M. Velten, dans les conférences mentionnées plus haut, s'est placé complétement au point de vue des „Etudes sur la bière" de M. Pasteur. Pour lui il s'agit seulement d'écarter les bactéries. Il ne tient aucun compte de ma doctrine des levûres alcooliques; quand il a débarrassé des bactéries la lèvûre de brasserie, elle est pure à ses yeux. Mes recherches ont cependant démontré avec certitude que les trois espèces de Saccharomyces ci-dessus nommées, le Sacch. Pastorianus I, le Sacch. Pastorianus III et le Sacch. ellipsoideus II occasionnent des maladies dans la bière de fermentation basse (voir les Comptes rendus des travaux du laboratoire de Carlsberg, II Vol. 2e liv., 1883, p. 52 et Zeitschrift für das ges. Brauwesen. München 1884, p. 273), et l'exactitude en a été confirmée par MM. A. Jørgensen, Grønlund, Will, etc. M. Will a de plus montré dans ces dernières années que, outre les trois espèces déjà nommées, il y a plusieurs autres Saccharomyces qui peuvent provoquer des maladies dans la bière. Tout semble même indiquer qu'il existe un grand nombre de pareilles espèces. La question de savoir si, par la culture de la levûre des brasseries dans la solution de sucre, on obtient ou non une purification, doit par suite se poser non seulement à l'égard des bactéries, mais aussi et tout spécialement à l'égard de ces levûres de maladie. En se plaçant à ce point de vue, ce n'est pas seulement la cinquième et la sixième expérience qui renversent l'assertion de M. Velten; mais en réalité il en est aussi de même des 4 premières expériences. Le procédé de M. Pasteur, que M. Velten recommande, pour purifier la levûre des bras-

series, ne produit donc aucune purification s'il s'agit de levûres de maladie, mais a au contraire pour effet que ces levûres se multiplient encore davantage, aussi bien quand on expérimente avec de la levûre haute qu'avec de la levûre basse de brasserie. Ce procédé ne peut donc pas du tout être employé dans les brasseries. Partout où il sera introduit, il occasionnera de grandes pertes d'argent et de grandes difficultés. Nous n'avons donc pas besoin d'examiner de plus près ce que M. Velten dit encore à ce sujet.

La sixième expérience montre également que la méthode, sous la forme qu'elle y a reçue, ne donne non plus aucune certitude d'obtenir une culture pure.

Au point de vue biologique, ces six expériences nous apprennent que les trois levûres basses de brasserie sur lesquelles il a été expérimenté ne peuvent supporter le traitement dans la solution de sucre additionnée d'acide tartrique; la levûre haute, le Sacch. cerevisiæ I, semble pouvoir y résister un peu mieux, mais elle aussi a dû céder le pas aux levûres sauvages; c'est le Sacch. Pastorianus I et le Sacch. ellipsoideus II qui ont manifesté la résistance la plus grande. Les résultats auraient peut-être été un peu différents, si l'expérience avait été faite dans d'autres conditions.

Ces recherches ont, sous un autre rapport, de l'importance pour nous; elles nous indiquent en effet que, dans la méthode ici décrite, nous pourrons sans doute trouver une ressource précieuse pour l'analyse pratique de la levûre des brasseries. S'agit-il de savoir si un échantillon donné renferme ou non des levûres de maladie, on emploie la méthode que j'ai donnée il y a quelques années en faisant des cultures de spores à 25 et à 15° C. Les levûres de maladie, dans ces circonstances, produisent en effet leurs spores de meilleure heure que les levûres basses des brasseries, et il y a en outre des différences dans l'aspect des spores. MM. Holm et Poulsen ont trouvé qu'à l'aide de cette méthode, on est à même de constater dans la levûre des brasseries un mélange de levûres de maladie tellement petit qu'il ne dépasse pas $^1/_2$ % (Compte rendu des travaux du laboratoire de Carlsberg, II Vol. 4e et 5e liv., p. 88 et 137). Il est cependant difficile de découvrir de si petits mélanges, et cela demande un assez grand exercice. Mais nous avons vu par ce qui précède qu'une culture dans une des solutions de sucre décrites plus haut, sera un bon moyen pour amener au moins quelques-unes des levûres de maladie qui peuvent se trouver dans la levûre des brasseries, à se multiplier avec plus de vigueur et, par conséquent, à se faire reconnaître plus

facilement qu'auparavant. Ce problème mérite d'être étudié de plus près, non seulement avec les trois levûres de maladie que j'ai décrites en 1883, mais aussi avec celles qui ont été découvertes dans les derniers temps, notamment par M. H. Will. En opérant à une température plus élevée, on arrivera sans doute plus vite à un résultat. Il sera également intéressant d'apprendre comment les espèces se comportent sous ce rapport quand, au lieu d'une solution de sucre, on emploie du moût de bière additionné d'acide tartrique.

J'aurais voulu, maintenant comme auparavant, éviter tout ce qui peut être appelé une critique des travaux de M. Pasteur, mais mes adversaires ne l'ont pas permis. Si nous cherchons à comprendre ce qu'au fond M. Pasteur a voulu dire quand il parle de préparer une culture pure à l'usage des brasseries, son ouvrage, il est vrai, ne nous fournit pas sur ce point des renseignements aussi clairs qu'on pourrait le désirer, mais tout semble cependant indiquer que, déjà en le publiant, il a lui-même reconnu les limites de ses méthodes (Etudes sur la bière p. 227), et qu'il n'a eu d'autre but que de purifier la levûre des brasseries de tout mélange avec des bactéries. Quand, p. 4—7, il donne un aperçu des maladies qui, d'après ses recherches, peuvent attaquer la bière, il n'est en effet question que de bactéries et pas du tout de levûres alcooliques (telle est aussi, nous l'avons vu, l'interprétation de M. Velten, et M. Duclaux, dans ses deux ouvrages, Chimie biologique, 1883, p. 618, et Le microbe et la maladie, 1886, p. 91—95, s'est également exprimé dans le même sens). Après avoir mentionné les différents procédés qu'il a employés en 1876 pour purifier la levûre, M. Pasteur conclut en ces termes p. 227: „Le meilleur moyen de s'assurer de la pureté d'une levûre consiste à en faire de la bière dans un de nos ballons à deux cols et à laisser séjourner ce ballon, après la fermentation, dans une étuve à 20° ou 25°. Si la bière, après quelques semaines, n'est pas trouble, si elle n'est pas couverte de fleurs, si son dépôt est pur au microscope, si la bière, enfin, n'est qu'éventée à la dégustation, on peut avoir toute confiance dans la pureté de la levûre qui l'a produite".

Veut-on, par ce moyen, seulement se renseigner sur la question de savoir si la levûre est mélangée ou non de bactéries et de mycodermes produisant des voiles, il est irréprochable. Mais s'agit-il en même temps de reconnaître si les cellules de levûre appartiennent à une ou à plusieurs espèces, il devient au contraire complètement impuissant. La levûre de dépôt peut même se composer d'un mélange de bonne levûre et de quelques-unes des pires espèces de levûres de maladie, sans que, dans ces circonstances, on soit en état de les découvrir. L'examen microscopique est, dans ce cas, tout à fait

insuffisant, et il en est de même des autres caractères indiqués par M. Pasteur. Des considérations théoriques le montrent déjà, et on en obtient des preuves manifestes en procédant à des expériences directes.

Le moyen que propose M. Pasteur n'est donc réellement efficace que si on le comprend comme s'appliquant exclusivement aux bactéries et aux mycodermes[1]).

M. Pasteur s'est exprimé sur cette question d'une manière plus claire dans le Bulletin de la société d'encouragement pour l'industrie nationale, janvier 1887, p. 45, où il dit: „M. Hansen a, le premier, bien compris que la levûre de bière de consommation devait être pure, non seulement sous le rapport des microbes, ferments et maladies proprement dites, mais qu'elle devait être privée des cellules de levûres sauvages".

La valeur du procédé de M. Pasteur consiste donc en ceci, qu'il permet de purifier la levûre de tout mélange avec des bactéries. Mais c'est une faute de rendre le traitement par la saccharose et l'acide tartrique aussi violent que le conseille M. Velten. Quand on recourt à cette méthode ou à une autre analogue, il faut procéder avec une grande prudence, et n'employer que de petites quantités d'acide et, en général, un traitement aussi modéré que possible; on

---

[1]) Plusieurs des devanciers de M. Pasteur ont déjà émis l'opinion que les levûres alcooliques peuvent, dans différentes circonstances, apporter du trouble dans l'exploitation des brasseries, mais ils ont, tout aussi peu que M. Pasteur, fait des recherches pouvant servir à éclaircir cette question, qui, encore en 1876, était regardée comme assez secondaire. On possédait bien déjà sur ce sujet une litérature assez considérable, mais ce n'était guère que des essais défectueux, des discussions obscures et des opinions contradictoires. M. Pasteur en faisait si peu de cas qu'il ne cite nulle part les contributions de ses devanciers. Avec les méthodes dont il disposait, une solution était du reste impossible. Son point de vue, scientifiquement parlant, est parfaitement juste; il trace les limites de ce qui est connu et de ce qui ne l'est pas.

Quelques revues zymotechniques ont, dans ces derniers temps, recommandé aux brasseurs l'essai, décrit plus haut, que M. Pasteur fait de la levûre dans un ballon à deux cols comme un moyen d'apprendre quelle sera la qualité de leur bière. Mais c'est là une grande méprise. La bière qu'on obtient dans le ballon est en effet d'une tout autre espèce que celle de la brasserie, même si le levain et le moût employés sont identiques. La fermentation s'est faite dans les deux cas dans des conditions si différentes que toute comparaison devient impossible. D'ailleurs l'idée de M. Pasteur n'a jamais été que le moyen indiqué par lui dût être compris de cette façon.

doit en un mot tâtonner, comme le dit M. Pasteur dans son ouvrage. Les expériences qui précèdent nous donnent à cet égard un renseignement important; elles nous montrent qu'on ne peut employer cette méthode avec certitude que dans les cas où le levain de brasserie qui doit être purifié des bactéries ne renferme pas d'autres levûres que l'espèce qu'on désire avoir. Le procédé rationnel est cependant aussi en pareil cas de faire une culture réellement pure. L'erreur de M. Velten est d'avoir cherché à le combattre.

Les travaux de M. Pasteur et les miens marquent deux points de vue différents.

Pour M. Pasteur, ce sont les bactéries qui produisent les maladies de la bière, et sa tâche a donc été de purifier la levûre de ces petits êtres; il y est arrivé, par exemple, par le procédé mentionné plus haut. Son but a été de purifier la levûre de bière et non d'en faire des cultures réellement pures.

Pour moi, ce sont au contraire les levûres alcooliques qui jouent le principal rôle. Lorsque j'eus montré, en 1883, que quelques-unes des maladies les plus ordinaires et les plus dangereuses de la bière ne sont pas dues à des bactéries, mais à certaines espèces de Saccharomyces, il résultait déjà de ce fait qu'une purification de la levûre comme celle que nous venons de décrire ne pouvait me conduire au but, mais qu'il fallait recourir à une culture réellement pure. Et une étude approfondie des Saccharomyces m'ayant fait voir que les idées que mes devanciers se formaient des espèces dans ce domaine étaient erronées, puisque, par exemple, sous le nom systématique de Sacch. cerevisiæ, se cachent toute une série d'espèces et de races de levûres hautes et basses dont l'action est très différente, il en est encore résulté qu'il ne suffisait pas de préparer des cultures pures, mais que, pour satisfaire aux conditions qui, suivant la nature différente du produit, doivent être remplies dans la fabrication des diverses sortes de bière, du vin, de l'alcool et de la levûre des boulangers, il fallait procéder à un choix méthodique de l'espèce ou de la race la plus convenable. C'est ainsi que j'en suis venu à introduire dans l'industrie de la fermentation les principes qui, dans l'horticulture et dans l'agriculture, ont été appliqués pendant si longtemps aux végétaux supérieurs.

Puisqu'ainsi je suis parti d'autres points de vue et ai employé d'autres méthodes que mon illustre devancier, mes résultats devaient aussi être différents. J'ai souvent relevé dans mes écrits la grande importance que les „Etudes sur la bière“ ont eue pour mes travaux, et je me plais à le répéter encore ici avec reconnaissance. Mais je

dois protester contre les essais qui ont été faits en France pour arrêter le développement de cette branche de la science, et ramener tout au point de vue de 1876, car cela est contraire à l'esprit du progrès. Si le maître vénéré de mes adversaires avait poursuivi ses études dans ce domaine, il les aurait lui-même poussées bien plus loin.

Décembre 1890.

# Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques

par

**Emil Chr. Hansen.**

---

## VIII.

## Sur la germination des spores chez les Saccharomyces.

(1r mémoire.)

---

### 1. Introduction.

La première communication sur les endospores des cellules de levûre se trouve sans doute dans les „Mikroskopische Untersuchungen" de Schwann (Berlin 1839, p. 234—236). Tout en donnant, dans ce travail, de nouvelles preuves en faveur de la célèbre théorie que Cagniard de Latour et lui avaient établie peu de temps auparavant, et d'après laquelle ce sont des cellules vivantes qui produisent la fermentation alcoolique, il examine aussi de plus près la nature de ces cellules. Il nous apprend qu'elles appartiennent aux champignons, qu'elles poussent de nouvelles cellules de leurs extrémités et qu'elles se multiplient comme les champignons, et cela de deux manières, soit par le procédé qui vient d'être indiqué, soit par la formation, dans l'intérieur des cellules, de nouvelles cellules qui deviennent libres par la rupture des cellules-mères.

C'est cependant à M. J. de Seynes (1868) que nous devons la première description claire de spores chez des cellules de levûre. Peu de temps après, M. Reess en a constaté l'existence chez plusieurs espèces, et donné quelques renseignements sur leur germination[1]). Il croit qu'elle se fait de la même manière chez toutes les espèces:

---

[1]) Reess, Botan. Untersuchungen über die Alkoholgährungspilze, 1870, p. 12, 26 75.

les spores gonflent et remplissent complètement la cellule mère, de sorte que la paroi de celle-ci se dissout ou se colle sur les cellules filles; la germination proprement dite consiste en ceci qu'ils poussent des bourgeons, qui deviennent ensuite des cellules de levûre semblables à celles dans l'intérieur desquelles les spores ont été originairement formés.

MM. Engel (1872), Brefeld (1876) et De Bary (1884) sont arrivés plus tard à des résultats analogues, sans y ajouter rien de nouveau.

Mes premières recherches sur ces organes de reproduction avaient principalement pour but de découvrir les lois de leur développement, et de créer une méthode telle qu'on pût avec certitude amener les cellules de Saccharomyces à en développer[1]). Pour obtenir la sporulation, il ne suffit pas en effet d'ensemencer quelque surface humide (tranches de carottes, blocs de plâtre, gélatine, etc.). En 1885, j'ai publié dans Botan. Centralblatt un court travail sur les formations, dites de cloisons, qui peuvent se produire dans les premières phases de la germination, et sur la soudure qui s'opère entre les parois de spores contigus. On en trouvera dans ce qui suit un exposé détaillé. Plus tard, j'ai en outre publié plusieurs études sur les phénomènes de variation, et notamment montré comment on peut opérer une transformation radicale de la cellule des Saccharomyces, en sorte qu'elle perd la faculté de développer des spores et, par conséquent, son caractére le plus important[2]).

Tandis que mes recherches précédentes sont, pour la plupart, de nature physiologique et biologique, j'ai dans celles dont il s'agit ici traité des questions d'évolution et de morphologie. J'ai à dessein limité mon travail à des études microscopiques des phénomènes de germination, et n'ai pas entrepris de recherches spéciales sur les facteurs qui interviennent dans ce processus. Les communications de mes devanciers sur la germination des spores sont dues à des observations faites sur différents exemplaires, et qu'ils ont ensuite réunies

---

[1]) Emil Chr. Hansen, Sur la formation des ascospores chez le genre Saccharomyces (Compte rendu des travaux du laboratoire de Carlsberg, II Vol. 2 Liv. librairie Hagerup, Copenhague, 1883, p. 13).

[2]) Emil Chr. Hansen, Ueber die in dem Schleimflusse lebender Bäume beobachteten Mikroorganismen. (Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde V Bd., 1889, p. 664 et suiv.). Production de variétés chez les Saccharomyces. (Annales de Micrographie, Tome II. Paris 1890, no. 5). Voir aussi le chapitre sur la variation chez les levûres dans mes „Untersuchungen aus der Praxis der Gährungsindustrie" Zweite Ausgabe, München 1890. Plus tard, j'ai constaté qu'au moins quelques-unes de mes variétés peuvent recouvrer la faculté de produire des endospores en passant l'hiver dans la terre.

en une seule image; ils n'ont pas poursuivi directement toutes les phases de la germination chez un seul et même exemplaire. Mais c'est seulement par là qu'on obtient une connaissance exacte de toutes les faces du phénomène, et il y a même certains caractères qu'on ne peut découvrir que par ce moyen. Aussi est-ce sur ce procédé que s'est portée surtout mon attention. Le plan que j'ai suivi a du reste été d'étudier une des espèces au moins voisines de celles qui ont été l'objet des recherches de mes devanciers, et ensuite, avec ce point de départ, d'entreprendre des études comparées sur d'autres espèces, pour voir si la germination, comme on le supposait jusqu'ici, se faisait réellement chez toutes de la même manière. Mes recherches ont été faites principalement sur trois espèces, le Sacch. cerevisiæ I, le Sacch. Ludwigii et le Sacch. anomalus. On trouvera un aperçu des résultats dans le dernier chapitre de ce mémoire.

## 2. Saccharomyces cerevisiæ I.

(J'ai traité cette espèce dans mes „Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques", Compte rendu des travaux du laboratoire de Carlsberg, II Vol. 2e Liv., 1883; 4e Liv., 1886 et 5e Liv., 1888. On trouvera, sous une forme facile à embrasser, un groupement de ces recherches dans le livre de M. Jørgensen „Die Mikroorganismen der Gährungsindustrie" 2te Ausgabe, Berlin 1890, et dans le manuel de M. Zopf „Die Pilze" Breslau, 1890).

Si, par le procédé décrit dans mon mémoire précité de 1883, on fait des cultures sur de la gélatine humide ou sur un bloc de plâtre humide à 25° C., un nombre plus ou moins grand de cellules renfermeront, au bout de 24 heures, des rudiments distincts de spores (Fig. 1 *a, b, c, d*).

Ces rudiments n'ont pas encore de parois distinctes, celles-ci ayant à peine commencé à se montrer; ils sont en liaison les uns avec les autres et, déjà dans cette première phase de leur développement, ils ont en croissant exercé une pression l'un sur l'autre (*a, c, d, e*). Ces figures, de même que *h, i, g,* montrent qu'il reste une partie du plasma de la cellule mère. Les toutes premières phases du développement n'ont pas encore été examinées exactement, et c'est pourquoi elles ne sont pas indiquées dans mon dessin; elles n'ont du reste pas d'importance pour la question dont il s'agit.

Après que ces cultures sont devenues d'un jour plus âgées, on y trouve un très grand nombre de cellules avec des spores, telles que *f, g, h, i, j.* Elles ont pris une forme ronde et les parois en sont plus ou moins distinctes; elles sont alors complètement développées.

Dans ces circonstances, la germination commence aussitôt après la maturation; toutes les phases du développement passent de l'une à l'autre d'une manière continue, sans qu'il y ait entre elles de limites précises. Le spore absorbe de l'eau et les substances nourricières qui y sont dissoutes, il grossit par là et les restes du plasma de la cellule mère disparaissent, ou laissent un résidu qui est comprimé entre les spores gonflés (Fig. 1 *h, i*), auxquels on le trouve souvent attaché sous forme de grains et de bandes transversales (Fig. 2 *e, f*). La masse mucilagineuse qui entoure les spores est bien due, au moins en partie,




Fig. 1.

Premières phases du développement des spores chez le *Sacch. cerevisiæ I.* Grossissement linéaire de 1000 fois.

au contenu de la cellule mère, mais il est probable que les spores sécrètent eux-mêmes une substance visqueuse. J'ai pu, par un examen microscopique, et dans certaines conditions, constater chez les cellules végétatives une forte production de mucilage, sous forme d'un réseau dans les mailles duquel sont logées les cellules de levûre (Compte rendu des travaux du laborat. de Carlsberg II Vol. 4e Liv., 1886, p. 126 du résumé français; voir également dans „Die Mikroorganismen der Gährungsindustrie". Zweite Ausgabe, Berlin 1890, de A. Jørgensen, la Fig. 24, qui reproduit les dessins que j'en ai donnés). Pendant les premières phases de la germination, le volume du spore augmente souvent à un très haut degré (comp., par exemple, la Fig. 1 avec la Fig. 2). Chez l'espèce que nous considérons, il arrive très souvent que les spores remplissent entièrement la cellule mère, et que la paroi de celle-ci s'applique si exactement sur eux qu'il n'est pas possible de la découvrir par un examen microscopique ordinaire. Pendant cette forte croissance et ce gonflement, les spores se pressent les uns contre les autres, ce qui leur fait perdre leur forme ronde, et il en résulte des figures cloisonnées (Fig. 2 *a, d;* Fig. 3 *c, d, e, f, g*).

En traitant la préparation par des réactifs chimiques et des matières colorantes ou en produisant une rupture, on découvre comment les spores se comportent en réalité. J'ai, dans la Fig. 2 *e*, représenté un groupe de quatre spores qui, avant la rupture de la paroi

de la cellule mère, avaient le même aspect que dans la Fig. 2 *d*; après la rupture, la membrane s'est resserrée autour du spore supérieur. Comme la membrane rompue occupe un volume bien moindre qu'auparavant, elle doit être élastique et avoir été fortement tendue autour des spores. On voit en *f* une membrane analogue rompue; les deux spores qui y sont représentés ont formé un petit bourgeon.

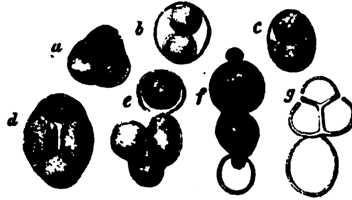



Fig. 2.

Spores commençant à germer chez le *Sacch. cerevisiæ I.* Grossissement linéaire de 1000 fois. La formation des cloisons se voit clairement dans *a*, *d*, *e* et *g*. Dans *e*, *f* et *g*, les parois de la cellule mère sont rompues, *g* est réellement cloisonné, car trois spores se sont fusionnés en un seul à plusieurs loges dont la paroi est rompue en trois endroits.

Les deux dernières figures nous apprennent en même temps que la formation des cloisons est due ici à la compression entre les spores d'un plasma très réfringent. On le voit clairement dans la Fig. 2 *e*, où le spore supérieur s'est détaché des autres. Une partie de ce plasma se trouve encore sur le spore, à gauche, et entre les deux spores inférieurs, qui sont restés unis. La Fig. 2 *f* nous montre également ce caractère; au milieu de la cloison, il y a un plasma brillant, comprimé en forme de coin, qui, des deux côtés, déborde un peu les spores, et ne peut par conséquent être une masse appartenant aux parois de ces derniers. Dans la Fig. 2 *b* et *c*, on n'observe au contraire aucune trace d'un pareil plasma. Ce que nous avons appelé ici la formation des cloisons provient donc soit de la compression, sous forme de coins ou de plaques, entre les spores fortement gonflés, d'une quantité plus ou moins grande de plasma, soit d'un contact intime, les unes avec les autres, des parois mêmes des spores.

Il y a cependant des cas où ces parois sont si fortement unies qu'il est impossible de les séparer, même en exerçant une forte pression sur la lame de verre couvre-objet, ou en la faisant glisser en avant et en arrière. Un traitement si violent produit finalement la rupture non seulement de la paroi de la cellule mère, mais aussi de

celles des spores. La Fig. 2 *g* présente un cas de ce genre. Au commencement de l'expérience, il y avait une cellule mère comme celle de la Fig. 2 *a*, dont la paroi était fortement tendue autour de trois spores où la formation des cloisons était très avancée. La Fig. 2 *g* nous montre la préparation après que la rupture s'est produite; on voit en bas la paroi de la cellule mère et, au-dessus, les spores unis entre eux, dont les parois sont rompues en trois endroits. Dans cette formation de cloisons, il n'a été possible de découvrir aucune fissure pouvant indiquer que la fusion entre les parois contiguës était incomplète. On a, en un mot, encore ici une nouvelle modification, à savoir un spore à plusieurs loges dont les parois forment une unité et, par conséquent, une véritable formation de cloisons.

Dès qu'ils sont formés, les spores peuvent commencer à bourgeonner. Le bourgeonnement, pour être bien actif, demande cependant un substratum favorable, un libre accès à l'oxygène de l'air et une température assez élevée. J'ai constaté dans mes expériences que ces conditions sont remplies quand on fait la culture dans du moût de bière houblonné et fortement aéré (8—12 % Ball.), à 25° C. On obtient à peine un développement aussi vigoureux en ajoutant à ce liquide nourricier 4—5 % de gélatine.

L'état où se trouvent les spores sur lesquels on opère, suivant qu'ils sont jeunes ou vieux, qu'ils ont ou non été desséchés avant d'être cultivés, exerce aussi quelque influence sur le développement. Dans l'eau et les substratum de qualité médiocre, le bourgeonnement peut bien se produire aussi vite que dans le moût de bière, mais il n'y a, dans ces circonstances, qu'un plus petit nombre de spores qui atteignent ce développement, et il s'arrête bientôt. Dans l'explication de la Fig. 3, on trouvera des indications de temps et quelques autres particularités concernant la germination.

Dans la Fig. 3, j'ai représenté 8 séries d'expériences, qui montrent comment le bourgeonnement se fait chez l'espèce dont il s'agit. J'ai suivi, sous le microscope, le développement pas à pas. Les spores ont été semés dans des chambres humides, partie dans du moût, partie dans de la gélatine mélangée de moût, et j'ai opéré aussi bien sur de vieux spores qui avaient été desséchés depuis longtemps que sur des spores jeunes de formation récente. Au point de vue morphologique, il ne s'est manifesté aucune différence. Comme il a été dit plus haut, les spores, au commencement de la germination, augmentant beaucoup de volume, la paroi de la cellule mère se tend par suite de plus en plus et finit par se rompre (*b'*, *c'*), quelquefois cependant seulement après qu'un des spores a poussé un bourgeon (*d'*, *d''*,

$d'''$). La paroi rompue se présente sous forme d'une membrane très mince, plissée et ridée, qui, semblable à un voile, recouvre en partie

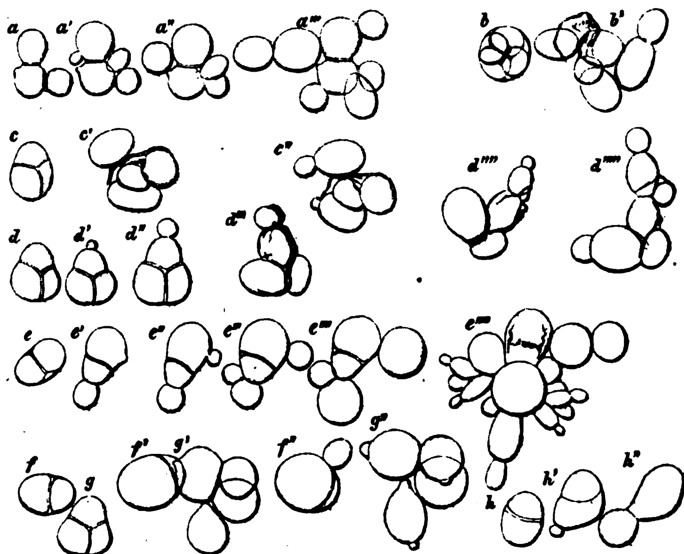


Fig. 3.

Bourgeonnement des spores chez le *Sacch. cerevisiæ I.* Grossissement linéaire de 1000 fois. La série $e$—$e''''$ provient d'une culture dans de la gélatine mélangée de moût de bière dans les chambres de Bøttcher, et les autres séries, d'une culture dans du moût de bière dans les chambres de Ranvier. La température était de 20° C. environ dans toutes les séries; *a* et *b* sont des spores qui, pendant 3 semaines, ont été soumis à un dessèchement assez fort; dans toutes les autres séries, on a employé des spores jeunes et frais; les indications du temps sont toujours comptées à partir du commencement de l'expérience. *a*, trois spores unis entre eux, mais sans la paroi de la cellule mère; $a'$, au bout de 19, $a''$, au bout de 22 et $a'''$, au bout de 30 heures. *b*, une cellule avec 4 spores, dont deux, qui sont dessinés avec un contour moins marqué que les autres, sont placés derrière ceux-ci; $b'$, la même 18 heures plus tard, la paroi de la cellule mère est rompue et un bourgeonnement commencé. *c*, une cellule avec 4 spores, dont 3 seulement sont visibles; $c'$, la même 9 heures plus tard, la paroi rompue de la cellule mère enveloppe en partie 3 des spores; $c''$, au bout de $10^1/_2$ heures. *d*, une cellule avec 3 spores; $d'$, au bout de $10^1/_2$, $d''$, au bout de 13 et $d'''$, au bout de 17 heures; dans cette dernière image, on voit à droite la paroi rompue de la cellule mère; $d''''$, au bout de 21 et $d'''''$, au bout de 25 heures. *e*, une cellule avec 2 spores; les dessins suivants $e'$—$e''''$ montrent les phases du développement après respectivement $7^1/_2$, $8^1/_2$, 11, 20 et 50 heures; en $e''''$ s'est formée une colonie très développée, et la cloison entre les deux spores est presque partout dissoute. *f* et *g*, deux cellules avec des spores; $f'$ $g'$, après 22 et $f''$ $g''$ après 25 heures de culture. *h*, une cellule avec 2 spores; $h'$, après 9 et $h''$, après 13 heures de culture; dans $h''$, la paroi entre les deux spores a disparu et ils n'en forment plus qu'un.

les spores que peu auparavant elle enveloppait complètement. Elle diffère beaucoup de la membrane ferme, élastique et assez épaisse qu'on trouve avant que la germination ait commencé. Souvent elle se dissout d'une manière insensible. Comme les figures le montrent, les spores continuent à grossir, quelquefois à un degré frappant (comp., par exemple, *a* avec *a'''* et *e* avec *e''''*), en même temps que le bourgeonnement se poursuit; c'est seulement quand il a duré quelque temps que leur croissance s'arrête. Ils peuvent, au bout de 30—50 heures, donner lieu à la formation de grandes colonies de cellules (*a'''*, *e'''''*). Un spore peut, comme une cellule végétative, pousser un ou plusieurs bourgeons, et cela de tous les points de sa surface.

Nous avons vu plus haut que les spores, pendant qu'ils sont encore renfermés dans la cellule mère, sont souvent fortement unis les uns aux autres, quelquefois même complètement soudés entre eux (Fig. 2 g). Après que la membrane qui les entourait s'est rompue pendant la germination, ils peuvent rester unis (Fig. 3 *a—a'''*; *d—d'''''*; *e—e'''''*), ou aussi se séparer (Fig. 3 *b—b'*; *c—c''*; *g—g''*).

Les séries *e—e'''''* et *h—h''* présentent un caractère remarquable. Nous voyons dans la première que la cloison entre les deux spores existe encore dans *e''''*, mais qu'elle est presque complètement dissoute dans *e'''''*, et que les deux spores n'en forment par suite qu'un seul. Le spore supérieur n'a poussé qu'un bourgeon, tandis que l'inférieur en a produit un plus grand nombre, il n'est donc pas invraisemblable qu'une partie du contenu du premier est absorbé par le second. Nous voyons de même que les deux spores *h*, pendant la croissance et le bourgeonnement, se sont transformés en un spore unique *h''*. Il semble ainsi que les spores, en pouvant se fusionner, sont par là mieux à même de bourgeonner dans des circonstances difficiles que lorsqu'ils sont séparés; telle est peut-être la signification biologique de ce phénomène. Un des spores semble, dans ce cas, jouer vis-à-vis de l'autre le rôle d'un parasite. C'est la première fois qu'une pareille observation a été faite chez les Saccharomyces. Nous avons peut-être un commencement de cette fusion dans le spore à plusieurs loges mentionné plus haut.

La Fig. 4 nous montre les différentes formes que j'ai observées en semant des spores, provenant de vieilles cultures humides ou desséchées, partie dans de l'eau, partie dans du moût, tantôt à 25° C., tantôt à la température du laboratoire. Je n'ai constaté aucune règle dans l'apparition des formes anormales, et n'ai observé rien de nouveau en employant d'autres substratum que les précédents. Une description plus détaillée de ces expériences ne serait donc d'aucun intérêt.

On a dans *g* et *i* des exemples que le bourgeonnement peut commencer en dedans de la cellule mère. Ici comme ailleurs dans ce mémoire, on a omis quelques détails qui se trouvent dans le texte danois.

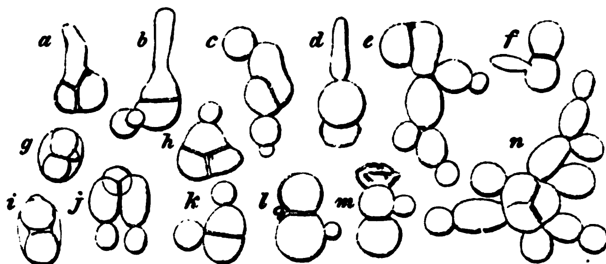



Fig. 4.
Bourgeonnement de vieux spores chez le *Sacch. cerevisiæ I.* Grossissement linéaire de 1000 fois.

Chez les espèces des groupes Sacch. Pastorianus et Sacch. ellipsoideus que j'ai examinées à ce point de vue, la germination, dans les points essentiels, se fait de la même manière que chez le Sacch. cerevisiæ I.

### 3. Saccharomyces Ludwigii.

J'ai appelé cette espèce d'après M. le professeur Dr. F. Ludwig, qui l'a découverte le premier. J'en ai donné une description morphologique et physiologique détaillée dans Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde V Bd., 1889, p. 638.

Il est assez rare, même dans de très vieilles cultures de spores, de trouver les formations de cloisons décrites chez le Sacch. cerevisiæ I. Il y a donc, sous ce rapport, quelque différence entre ces deux espèces. Dans de vieilles cultures de spores sur des blocs de plâtre humides, la paroi de la cellule mère se dissout d'ordinaire sans laisser de traces; il est du moins très rare qu'on en trouve quelque reste. C'est aussi seulement par exception que les spores, dans ces circonstances, commencent à bourgeonner; par contre, j'ai souvent observé que des groupes de spores pouvaient s'agglutiner en masses plus ou moins grandes. En pareil cas, ce sont sans doute les parois dissoutes des cellules mères qui servent surtout de liaison. Les spores sont ronds et ont une grandeur de 3—4 micromillim. Dans les cellules renfermant peu de spores, on voit quelquefois distinctement un reste de plasma fixé en partie à la paroi, en partie à la surface des spores.

Comme à l'ordinaire, les spores, chez cette espèce, augmentent aussi de volume quand la germination commence. La paroi de la cellule mère se dissout beaucoup plus vite que chez le Sacch. cerevisiæ I, et c'est aussi une des raisons pour lesquelles il ne peut se former de cloisons. De la partie qui est particulièrement le siège d'une formation nouvelle pousse un prolongement verruqueux ou en forme de boudin, (voir Fig. 5, *c'*, *d'*, *e''*, *g'*, *h'*). Il se présente ici deux cas, ces formations nouvelles pouvant continuer à croître chacune à part (*g*—*g'''''* et *h*—*h''''*) ou aussi se fusionner avec les voisines (voir les 6 premières séries de la Fig. 5).

Par cette fusion, deux spores, à l'origine séparés dans les séries précitées, se sont complètement unis de manière à n'en former qu'un seul, bien qu'il restât une partie de la paroi qui les séparait à l'origine. Dans *a*—*a'''*, ce sont les deux spores inférieurs qui se sont fusionnés; dans *b*—*b''*, ce sont les deux groupes de spores, chacun à part.

On voit clairement en *c'* et *c''* la fusion entre les deux spores inférieurs. Toutes les phases de la fusion sont représentées dans *d*—*d''* et *e*—*e'''*; nous voyons comment les formations nouvelles se placent l'une contre l'autre pour se fusionner peu de temps après, quand les parois aux points de contact se dissolvent (*d''* et *e'''*). La partie du spore ainsi formé qui n'a pas directement pris part à la formation nouvelle se distingue, comme le montre les figures, par des contours plus marqués, et on peut, en regardant cette partie, déterminer combien de spores se sont fusionnés.

Les formations nouvelles qui sont soudées entre elles apparaissent souvent sous forme d'un tube germinatif (*c''*—*c'''*, *d'''*—*d''''*, *e'''*), quelquefois aussi comme une gibbosité plus ou moins ronde (*a'*—*a''*). Dans tous les cas, cette formation nouvelle est l'endroit d'où se fait plus tard le développement des cellules de levûre; la partie restante du spore reste telle qu'elle est, ce que les séries *c*—*c'''''* et *d*—*d'''''''* montrent clairement. Quelle que soit celle de ces deux formes sous laquelle les formations nouvelles se présentent, c'est de là que se développent les cellules de levûre comme des protubérances verruqueuses ou en forme de boudin, qui, après avoir atteint une certaine grandeur, sont délimitées par une paroi transversale bien marquée (*a'''*, *c'''*, *d''''*—*d'''''''*). Quand la nouvelle cellule de levûre se détache, cela ne se fait pas par un étranglement comme chez les autres espèces de Saccharomyces, mais elle se sépare de la cellule mère avec une surface terminale plane qui ne s'arrondit que plus tard. Dans les cas où la formation nouvelle a la forme d'un tube germinatif, c'est en général au sommet de ce dernier que les cellules

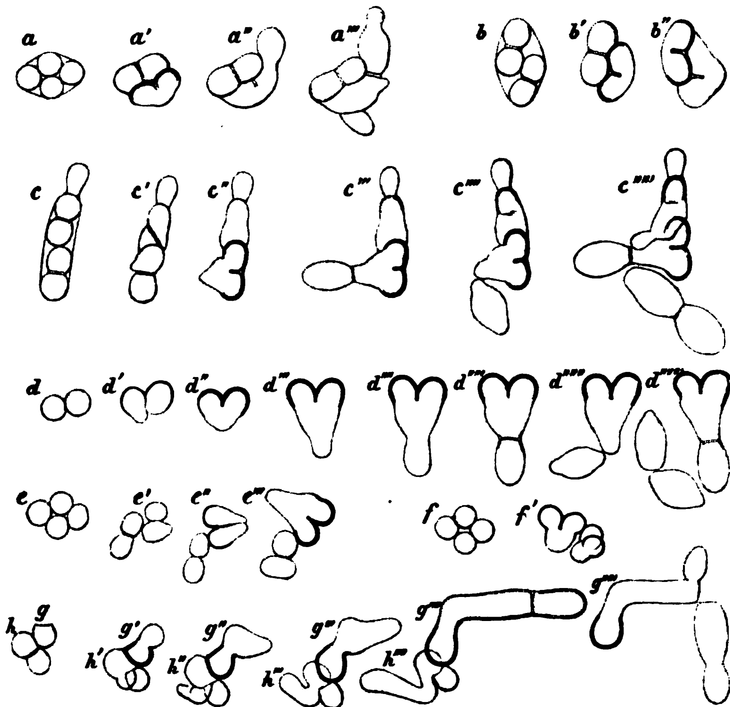



Fig. 5.

Bourgeonnement des spores chez le *Sacch. Ludwigii.* Grossissement linéaire de 1000 fois. Les spores des trois premières séries ($a$—$a'''$, $b$—$b''$ et $c$—$c'''''$) proviennent d'une culture normale sur des blocs de plâtre humides exposés pendant 12 jours à la température de 25° C.; les spores des quatre dernières séries proviennent également d'une culture sur des blocs de plâtre, mais ceux-ci ont été exposés pendant $1^1/_2$ mois à la température du laboratoire. La culture a été faite dans du moût de bière, dans les chambres de Ranvier: la série $a$—$a'''$ à 25° C. et toutes les autres à 18—20° C. Les indications du temps sont toujours comptées à partir du commencement de l'expérience. $a$, une cellule avec 4 spores; $a'$, au bout de 8, $a''$, au bout de 25 et $a'''$, au bout de 26 heures. $b$, une cellule avec 4 spores en deux groupes; $b$, au bout de $9^1/_2$ et $b''$, au bout de 12 heures. $c$, une cellule en forme de boudin, renfermant en deux groupes 4 spores, elle a poussé un bourgeon; $c'$ au bout de 12; $c''$, au bout de 15; $c'''$, au bout de 20; $c''''$, au bout de 24 et $c'''''$, au bout de 27 heures. $d$, deux spores libres; $d'$, au bout de 18; $d''$, au bout de 20; $d'''$, au bout de 26; $d''''$, au bout de 28; $d'''''$, au bout de 29; $d''''''$, au bout de $30^1/_2$ et $d'''''''$, au bout de 33 heures. $e$, quatre spores libres; $e'$, au bout de 22; $e''$, au bout de 26 et $e'''$, au bout de 31 heures. Dans $e'''$ le groupe de spores a changé sa position primaire. $f$, quatre spores libres; $f'$, après 19 heures. $gh$, un groupe de trois spores dont les deux inférieurs, $h$, ont été contigus, mais ensuite séparés par une fente; le spore supérieur, $g$, s'est aussi séparé de la même manière d'un quatrième spore qu'on ne voit pas; il reste encore des marques de cette union antérieure. $g'h'$, au bout de 17; $g''h''$, au bout de 21; $g'''h'''$, au bout de 23; $g''''h''''$, au bout de $26^1/_2$ et $g'''''$, au bout de 28 heures. Le spore inférieur dans ce groupe ne s'est pas développé.

de levûre se développent l'une après l'autre, de sorte que la croissance est alors liée à une partie déterminée ($c''' - c'''''$, $d'''' - d'''''''$). Il y a cependant des exceptions à cette règle, comme on le verra plus loin. La formation nouvelle qui se présente comme une gibbosité, et dont nous avons un exemple dans $a'' - a'''$, développe des cellules de différents points. La séparation des cellules nouvelles d'avec la cellule mère se fait toujours de la manière ci-dessus décrite. Pour plus de détails, voir du reste l'explication de la Fig. 5. Chez les cellules de levûre développées des spores, les bourgeons poussent aussi des extrémités, et ils sont ensuite également délimités par des parois transversales; telle est en tout cas la règle.

Cette fusion de tubes germinatifs et de spores est très ordinaire; c'était la forme de germination la plus fréquente quand on faisait l'ensemencement avec des spores jeunes et frais. A mesure que les spores vieillissent, soit qu'on les conserve humides ou desséchés, il arrive plus souvent que chaque spore germe séparément sans se fusionner avec d'autres. Des cultures humides de spores, âgées de 40 jours, renfermaient cependant des groupes de spores formant, après une culture dans du moût dilué, les fusions représentées dans la Fig. 5. Mais ces groupes de spores ayant été desséchés par une exposition d'un peu plus d'un mois à la température de laboratoire, chaque spore a germé séparément sans fusion aucune. Dans un autre cas, j'ai opéré avec une culture jeune dont les spores, pendant leur germination, formaient constamment les fusions ci-dessus mentionnées. Ces spores, après avoir été desséchés en restant exposés pendant 22 jours à la température du laboratoire, ont été de nouveau examinés; de ceux qui ont germé, les $^{2}/_{3}$ seulement ont alors formé des fusions, le reste a germé séparément. Ce résultat s'accorde avec celui que m'a donné une recherche antérieure (voir mon mémoire cité plus haut), faite sur des spores desséchés qui étaient restés 39 jours exposés à la température du laboratoire. Dans ces circonstances, je n'avais observé aucune fusion. Que de jeunes spores pussent donner un tout autre résultat, je ne l'avais alors pas encore constaté; je me proposais aussi un but tout différent.

Les séries $g - g'''''$ et $h - h''''$ fournissent des exemples de spores dont chacun forme son tube germinatif particulier.

Nous avons vu plus haut que les spores, pendant qu'ils sont renfermés dans la cellule mère, s'unissent souvent en groupes de deux spores chaque. Tant qu'ils sont jeunes, il se fera en général une fusion entre les tubes germinatifs provenant d'un pareil groupe. Chez les vieux spores, cela arrive au contraire rarement, car souvent un des spores ne se développe pas du tout, et souvent aussi il y a dans le

développement une différence si grande que l'un des tubes germinatifs peut déjà avoir atteint une longueur notable, tandis que l'autre apparaît à peine comme une petite protubérance; enfin les deux spores peuvent pousser un tube germinatif chacun dans une direction différente. En pareil cas, on s'explique qu'une fusion ne puisse avoir lieu, mais on trouve aussi dans de vieilles cultures des spores groupés qui développent en même temps des tubes germinatifs parallèles et dans la même direction, sans que cependant il se produise une fusion, et ici il n'y a, au moins pour le moment, aucune explication à donner.

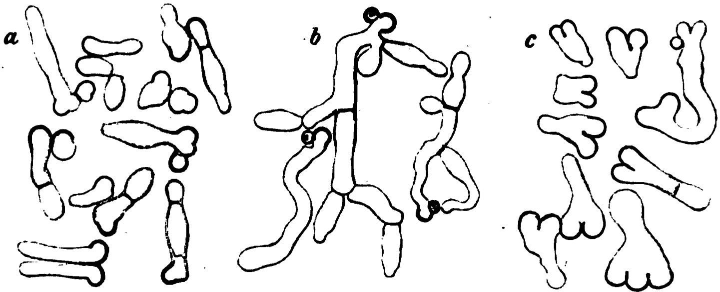



Fig. 6.

Spores germantes du *Sacch. Ludwigii.* Grossissement linéaire de 5—600 fois. Les spores proviennent de vieilles cultures sur des blocs de plâtre; la germination s'est faite dans du moût de bière. En *a* et *b* sont représentés des groupes de spores dans lesquels chaque spore a développé son tube germinatif particulier. *a* représente les premières phases de la germination, *b*, un développement plus avancé; on voit dans le groupe *c* différentes formes de fusions. Les vieilles parois des spores se reconnaissent, comme dans les figures précédentes, à leurs contours fortement marqués.

Les groupes *a* et *b*, Fig. 6, donnent des exemples de toutes ces variations. Le groupe *a* nous fournit en outre des exemples de longs tubes germinatifs, qui, même après qu'une cellule de levûre a été délimitée par une paroi transversale, ont conservé une longueur notable, tandis que d'autres dans ces circonstances disparaissent presque, les cloisons transversales se trouvant tout près du spore. En *b* sont représentés trois spores avec des tubes germinatifs, dont deux se sont développés en un mycelium ramifié d'où naissent des cellules de levûre [1]).

---

[1]) Déjà dans mon mémoire cité plus haut: „Ueber die im Schleimflusse lebender Bäume beobachteten Mikroorganismen", j'ai fait remarquer que de vieilles végétations développaient souvent des formations de mycelium avec des cloisons transversales distinctes, en un mot avec l'aspect typique

La groupe *c* montre différentes formes de fusion; en haut, à droite, on voit deux spores dont les tubes germinatifs fusionnés au sommet développent contre la règle trois bourgeons à la fois; au-dessous est représentée une fusion de trois spores; quatre spores peuvent aussi s'unir de cette manière.

Comme l'indique le groupe *a*, la paroi du spore se compose d'une seule membrane qui se continue dans la formation nouvelle. J'ai aussi observé des formes analogues de développement en cultivant les spores dans de la gélatine mélangée de moût et dans une solution de dextrose et d'eau de levûre.

Plusieurs des cellules de levûre nouvelles provenant de la germination des spores ont, dans le moût des chambres humides où elles étaient nées, rapidement développé des spores dans leur intérieur; par contre, j'ai observé que cela n'arrivait jamais dans les tubes germinatifs.

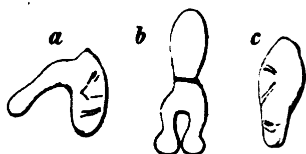



Fig. 7.

Fusions anormales provenant de la germination de jeunes spores du *Sacch. Ludwigii.* Grossissement linéaire Fig. 7. 1000 fois.

Dans cette figure sont représentées des fusions qui diffèrent un peu des précédentes. Elles se sont produites au bout de 9 heures dans une culture de jeunes spores dans du moût dilué à 25° C.

Dans quelques cas, on a trouvé des fusions telles que *b*, où deux spores libres ont chacun poussé un tube germinatif. Après avoir crû librement pendant peu de temps, les deux tubes germinatifs se sont fusionnés à leur sommet, et de là s'est développé un bourgeon qui, comme d'ordinaire, a été délimité par une cloison verticale. Cette culture renfermait plus souvent des formes comme *a* et *c*, dans lesquelles les trois ou quatre spores d'une cellule se sont fusionnés plus

---

d'une mycelium. Vu la manière dont elles se sont produites, j'ai dû les regarder comme une formation anormale. Un des dessins que j'en ai donnés se trouve dans l'ouvrage de M. Zopf: „Die Pilze“ (Breslau 1890) Fig. 135. Mais les recherches exposées plus haut montrent qu'une formation de mycelium apparaît souvent aussi dans la germination de vieux spores; dans ce cas, il n'est pas question de quelque chose de maladif ni d'anormal.

ou moins complètement en un seul spore. Dans ce cas, la fusion commence dans les toutes premières phases de la germination; les parois primitives se dissolvent peu à peu, on en voit pendant les premiers temps des restes, mais ils finissent en général par disparaître. Dans les fusions de ce genre, on ne peut plus constater dans les dernières phases combien de spores il y avait à l'origine. Comme on le voit dans *a*, cette forme peut aussi produire des tubes germinatifs; je n'ai du reste pas poursuivi plus loin ce genre de fusion.

On a supposé jusqu'ici que la germination des spores chez le genre Saccharomyces se faisait seulement par un bourgeonnement. Mais, dans les recherches exposées plus haut sur le Sacch. Ludwigii, j'ai réussi à constater des formes de germination complètement différentes de celle qui était connue auparavant. En comparant les séries de développement du Sacch. cerevisiæ I représentées dans la Fig. 3 avec les séries analogues du Sacch. Ludwigii, Fig. 5 et 6, on verra très clairement les différences. Chez le Sacch. cerevisiæ I, il peut de chaque point de la surface du spore germant se développer des bourgeons, et très souvent il s'en forme en même temps deux ou plusieurs. Mais, dans la germination des spores chez le Sacch. Ludwigii, le spore se comporte tout autrement. La formation nouvelle ne naît que d'une seule partie du spore, et elle présente, surtout quand elle est devenue longue, plutôt le caractère d'un tube germinatif que d'un bourgeon. Chaque spore ne développe qu'une seule formation nouvelle, soit qu'elle continue à vivre seule ou se fusionne avec une autre. C'est de là et non du spore même que découle tout le développement ultérieur (Fig. 5 $a'''$, $c''$—$c'''''$, $d'''$—$d'''''''$, $g'$—$g''''$). On a coutume en morphologie de désigner un intermédiaire de ce genre sous le nom de promycelium. Mes figures montrent qu'il peut avoir une grandeur et une forme différentes. Relativement à la germination des spores, le Sacch. Ludwigii, en opposition à tous les autres Saccharomyces examinés jusqu'ici, se distingue donc en ceci, que les cellules de levûre ne se développent pas directement du spore même, mais d'un promycelium. Une autre particularité importante, est la fusion qui se fait en général entre les formations nouvelles des jeunes spores, et enfin on peut aussi relever que les cellules de levûre ne deviennent pas libres par un étranglement, comme chez les autres Saccharomyces, mais par la formation d'une cloison transversale suivie de la séparation.

Une fusion des conidies germantes et de leurs tubes germinatifs a souvent été observée chez différents champignons. Les premières observations de ce genre sont sans doute dues à Tulasne. Dans le

troisième volume de son célèbre ouvrage, Selecta Fungorum Carpologia, on en trouve de nombreux exemples. Autant que je sache, on n'a rien observé de semblable en ce qui concerne les ascospores[1]). En tout cas, ce phénomène n'a jusqu'ici jamais été observé chez les Saccharomyces. Mais, comme je l'ai constaté chez deux des espèces étudiées, il est vraisemblable qu'il le sera aussi successivement chez d'autres. Il y a cependant une grande différence dans la manière dont il se manifeste chez le Sacch. cerevisiæ I et le Sacch. Ludwigii. Chez le premier, il fait l'impression d'être anormal et rare. La fusion a eu lieu entre les spores fortement unis d'une cellule mère, la cloison qui les séparait s'étant dissoute peu à peu, mais seulement après que le bourgeonnement était très avancé, et il ne s'est fait aucune fusion entre les formations nouvelles elles-mêmes (Fig. 3 *e''''*—*e'''''*, *h'*—*h''*). Ce qui, chez le Sacch. cerevisiæ I, est une exception, est au contraire fréquent chez le Sacch. Ludwigii, et, dans certains conditions, s'est montré être la règle. Chez ce dernier, la fusion, comme nous l'avons fait remarquer, s'opère d'une tout autre manière, ce sont ici justement les formations nouvelles qui se fusionnent tout de suite (Fig. 5 *d*—*d''*, *e*—*e'''*). Un examen des figures citées montre mieux qu'une longue description la grande différence que les phénomènes de fusion présentent chez les deux espèces.

Je ne puis, pour le moment, rien dire de certain sur la signification biologique de ce phénomène. Chez le Sacch. cerevisiæ I, il semble consister en ceci, qu'un des spores cherche à s'alimenter chez l'autre pour satisfaire aux exigences de la formation de nouveaux bourgeons; c'est donc une espèce de parasitisme. Comme nous avons vu que la fusion, chez le Sacch. Ludwigii, a un tout autre caractère, cette explication ne convient pas ici. Peut-être la fusion sert-elle, dans ce cas, à mettre les spores en état de développer un nombre relativement plus grand de cellules de levûre. En pareil cas, les spores jeunes et frais auraient aussi par la même raison plus de facilité pour donner une plus riche végétation que les spores âgés. On ne saurait la considérer comme un véritable acte sexuel.

### 4. Saccharomyces anomalus nov. spec.

Je propose de désigner sous ce nom une espèce, sous plusieurs rapports très particulière, que j'ai trouvée dans une levûre de brasserie impure que j'ai reçue, il y a quelques années, de la Bavière.

---

[1]) On trouve un aperçu des recherches sur ce sujet dans le manuel de M. Zopf „Die Pilze“ (Breslau 1890), Fusionsbildungen p. 115.

Il fait rapidement fermenter le moût de bière aussi bien à la température du laboratoire qu'à 25° C. Dès le commencement de la fermentation, pendant que de nombreuses bulles de gaz montent à la surface, il s'y forme un voile d'un gris mat, ce qui rappelle beaucoup mon Monilia candida. Pendant la fermentation, le liquide devient trouble, en général un peu opalin, et dégage une forte odeur d'éther de fruits. L'image microscopique des cellules rappelle surtout plusieurs espèces de Torulas que j'ai décrites dans divers mémoires; à en juger par son aspect, on le rapporterait aussi plutôt à ces derniers qu'au genre Saccharomyces. Dans les conditions ci-dessus, il se présente comme de petites cellules de levûre en général ovales, quelquefois aussi en forme de boudin, et, au bout de quelque temps, on trouve tant dans le voile que dans la levûre de fond des cellules assez nombreuses avec des endospores. Entre les cellules du voile est interposée une grande quantité d'air. De quelque manière qu'on fasse varier les modes de culture, il ne se produit que les cellules de levûre ci-dessus mentionnées et des endospores.

Nous nous occuperons ici des spores et de leur germination. Ils se développent dans différents substratum nourriciers, tant liquides que solides, comme aussi dans les circonstances où les cellules mères disposent d'une nourriture abondante. Les cultures ordinaires sur des blocs de plâtre à 25° C. ont donné un assez grand développement de spores.

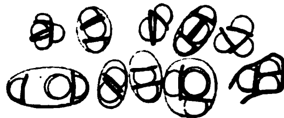


Fig. 8.

Spores du *Sacch. anomalus*. Grossissement linéaire de 1000 fois. Quelques-uns sont libres; d'autres sont renfermés dans les cellules mères. En bas, à droite, on voit la paroi rompue d'une cellule mère qui renferme encore trois spores.

On trouve dans chaque cellule mère 2—4 spores et, comme le montre la Fig. 8, ils peuvent être disposés de différentes manières. Le spore même est plus ou moins hémisphérique avec un filet saillant partant de la base; le diamètre de la base, le filet non compris, est de 2—3 micromillim.

La paroi de la cellule mère est très fragile et aussi en trouve-t-on souvent de rompues. Je n'ai observé aucun signe des cloisons mentionnées plus haut, même dans de très vieilles cultures de spores.

L'étude de la germination des spores chez le Sacch. anomalus présente des difficultés particulières. Je n'ai réussi qu'incomplètement à observer ce développement chez de jeunes spores. Par contre, en semant un à un de vieux spores, sans mélange de cellules végétatives, dans des chambres humides de Ranvier avec du moût de bière dilué, et en faisant des cultures à 22—28° C., j'ai pu suivre pas à pas le développement des trois séries représentées dans la Fig. 9. Dans $a$—$a''''$ et $c$—$c'''$, le spore a conservé toute sa forme pendant la germination, en $b$—$b'''''$, il a au contraire perdu son rebord saillant.

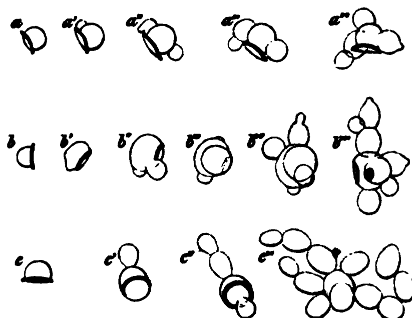


Fig. 9.

Germination des spores chez le *Sacch. anomalus*. Grossissement linéaire de 1000 fois. La semence provenait d'une culture sur des blocs de plâtre vieille de plusieurs mois et en partie desséchée. La culture a été faite dans du moût de bière et les chambres humides de Ranvier. $a$—$a''''$ à 28° C., $b$—$b'''''$ et $c$—$c'''$ à 23° C. Les indications du temps sont toujours comptées à partir du commencement de l'expérience. $a$, un spore avec la base tournée à gauche; $a'$ au bout de 7; $a''$, au bout de 12; $a'''$, au bout de 15, et $a''''$, au bout de 20 heures. $b$, un spore avec la base tournée à droite; $b'$, au bout de 10; $b''$, au bout de 21; $b'''$, au bout de 24; $b''''$, au bout de 25 et $b'''''$, au bout de 27 heures. Dans $b'''''$, la position du spore est autre que dans les termes précédents de cette série. $c$, un spore dont la base est tournée en bas; $c'$, au bout de 8; $c''$, au bout de 10 et $c'''$, au bout de 21 heures.

Comme ces figures le montrent, la germination consiste en ceci, que le spore se gonfle et pousse ensuite peu à peu de différents points de sa surface des bourgeons qui se multiplient à leur tour par bourgeonnement. Pour les détails concernant ces trois séries, je me réfère à l'explication de la Fig. 9.

La germination des spores se fait plus facilement lorsqu'ils sont isolés que lorsqu'ils sont en groupes. Le mieux est donc de les détremper d'abord dans l'eau et puis de n'en mettre dans chaque chambre qu'un seul ou, en tout cas, un très petit nombre.

Pendant ces cultures, la germination des spores s'est toujours effectuée par bourgeonnement, et il en est résulté des cellules de levûre de la même espèce que celles qui avaient développé les spores dans leur intérieur.

Les spores décrits diffèrent beaucoup dans leur forme de ceux des autres espèces de Saccharomyces, et ont seulement, sous ce rapport, quelque ressemblance avec les spores du Sacch. membranæfaciens. Je me propose aussi, dans la suite de ces études, de publier une recherche sur les spores de cette dernière espèce et sur leur germination, en l'accompagnant des dessins nécessaires. Je ne m'étendrai donc pas davantage ici sur cette question.

Les spores du Sacch. anomalus ont la même forme que les spores de l'Endomyces decipiens. Cette intéressante espèce a été trouvée par M. De Bary sur les lamelles de l'Agaricus (Armillaria) melleus[1]. Mais il n'a pas réussi à en faire germer les spores; d'après M. Reess, cette germination se fait par des tubes germinatifs et non, par conséquent, par bourgeonnement[2]. En 1885, M. Fayod a décrit une nouvelle espèce de ce genre, à savoir l'Endomyces parasiticus, dont les spores, cependant, diffèrent complètement des précédents[3].

Comme nous l'avons vu, les spores de mon espèce, le Sacch. anomalus, sont identiques, quant à la forme, à ceux de l'Endomyces decipiens; seulement ils sont beaucoup plus petits. Mais il y a entre les deux espèces des différences plus importantes, car le Sacch. anomalus ne développe que des cellules de levûre et des endospores, et la germination de ses spores consiste en un bourgeonnement ordinaire qui produit de nouvelles cellules de levûre, tandis que la germination des spores chez l'Endomyces decipiens, d'après M. Reess, donne naissance à des tubes germinatifs et non à des cellules de levûre. Il n'est cependant pas invraisemblable que ces caractères puissent, dans de nouvelles conditions de culture, se présenter un peu autrement; à cela vient s'ajouter que l'Endomyces decipiens n'a été l'objet d'aucune recherche dans le cours des vingt dernières années. On peut donc supposer qu'une recherche faite à de nouveaux points de vue nous apportera aussi de nouveaux renseignements.

---

[1] De Bary, Zur Kenntniss einiger Agaricineen (Botan. Zeitung, 1859, p. 401).

[2] Reess, Botan. Untersuchungen über die Alkoholgährungspilze, 1870, p. 77.

[3] Fayod, Notes sur quelques champignons parasites nouveaux ou peu connus (Annales des Sciences Nat. Septième Série. Botanique, T. 2, 1885, p. 28).

L'Endomyces decipiens a un intérêt spécial, parce que, comme M. Reess l'a fait observer, il semble être voisin des Saccharomyces. Par ces motifs, quelques mycologues et moi, nous avons, dans le cours de l'automne, cherché avec beaucoup de zèle ce champignon, mais sans le découvrir. J'ai très souvent trouvé des exemplaires de l'Agaricus (Armillaria) melleus, dont les lamelles étaient couvertes d'une forme d'Oidium, mais je n'ai pas observé de mycelium avec des asci, ni des spores endogènes, même après avoir, pendant plusieurs mois, cultivé de différentes manière cet Oidium. Les échantillons que M. le professeur Dr. F. Ludwig a eu l'obligeance de m'envoyer de Thüringen ont donné le même résultat. Mes recherches n'ont naturellement pas pu décider si l'Oidium en question appartient ou non à l'Endomyces decipiens. En somme, il ne m'a pas été possible jusqu'ici d'obtenir cette dernière espèce. Si quelqu'un de mes lecteurs pouvait m'en envoyer des exemplaires vivants, ils seraient reçus avec une grande reconnaissance.

### 5. Récapitulation.

Dans l'introduction (p. 44), j'ai donné un aperçu de la littérature concernant les spores chez les Saccharomyces: Schwann, 1839; J. de Seynes, 1868; Reess, 1870; Emil Chr. Hansen, 1883—1890.

Sur la germination, M. Reess a communiqué ce qui suit: les spores se gonflent et finissent par remplir entièrement la cellule mère, de sorte que la paroi de celle-ci ou se rompt, ou se colle sur les cellules filles; la germination proprement dite consiste en ceci, que les spores poussent des protubérances gemmiformes, qui donnent ensuite naissance à des cellules de levûre semblables à celles dans l'intérieur desquelles ils se sont d'abord eux-mêmes développés. M. Reess croit que la germination se fait de cette manière chez toutes les espèces du genre.

Les chapitres suivants traitent des recherches que j'ai faites sur la germination chez les trois espèces suivantes: le Sacch. cerevisiæ I, le Sacch. Ludwigii et le Sacch. anomalus. A l'inverse de ce qu'ont fait mes devanciers, j'ai suivi toutes les phases de la germination chez un seul et même spore, en faisant la culture dans une chambre humide sous le microscope.

Les expériences sur le Sacch. cerevisiæ I (p. 46) nous apprennent que les spores, dans les premières phases de la germination, peuvent se gonfler de manière à produire des formations de cloisons par la pression qu'ils exercent les uns sur les autres pendant qu'ils se trouvent encore dans la cellule mère. Il en résulte que du plasma, en

quantité plus ou moins grande, est comprimé sous forme de coins ou de plaques entre les spores, ou aussi que les parois de ces derniers s'appliquent les unes sur les autres. Cela peut même aller jusqu'à une soudure complète, et il se produit alors une véritable formation de cloisons (Fig. 2 *g*).

La paroi de la cellule mère, qui, à l'origine, est assez épaisse et élastique, se tend à un haut degré pendant la germination, et devient par suite de plus en plus mince. Quand le bourgeonnement des spores commence, elle peut ou se rompre, ou se dissoudre peu à peu. Les parois rompues se présentent sous forme de minces membranes plissées et ridées qui couvrent en partie, comme d'un voile, les spores qu'elles avaient renfermés peu de temps auparavant (Fig. 3 $b'$, $c'—c''$, $d'''—d'''''$).

Les bourgeons peuvent pousser sur un point quelconque de la surface des spores, et quelquefois pendant que ces derniers se trouvent encore dans la cellule mère (Fig. 4 *g* et *i*). Après le bourgeonnement, les spores restent souvent unis les uns aux autres, mais ils peuvent aussi se séparer rapidement.

La Fig. 3 $e—e'''''$ et $h—h''$ nous montre ce cas intéressant que les parois de deux spores contigus se sont dissoutes et que leur contenu s'est mélangé. Un des spores semble alors jouer vis-à-vis de l'autre le rôle de parasite.

Tandis que, chez le Sacch. cerevisiæ I, je n'ai observé qu'exceptionnellement une fusion, ce phénomène est au contraire très fréquent chez le Sacch. Ludwigii (p. 52) pendant la germination des jeunes spores, mais il se produit d'une tout autre manière. Chez le Sacch. cerevisiæ I, il a lieu seulement après que les spores ont commencé à bourgeonner, mais jamais entre les formations nouvelles; chez le Sacch. Ludwigii, au contraire, la fusion se fait dans les toutes premières phases de la germination, et ce sont précisément les formations nouvelles qui se fusionnent (Fig. 5—7). Il en résulte souvent des formes très singulières, surtout quand la fusion se fait entre plus de deux spores.

Relativement à la germination des spores, le Sacch. Ludwigii se distingue en outre de tous les autres Saccharomyces examinés jusqu'ici par ce caractère, que les cellules de levûre ne se développent pas directement des spores mêmes, mais d'un promycelium (Fig. 5 et 6).

Comme le montre la Fig. 8, les spores, chez le Sacch. anomalus (p. 59), sont remarquables par leur forme, et diffèrent sous ce rapport des autres Saccharomyces. Comme ils ressemblent complètement aux spores de l'Endomyces decipiens, il y avait un grand intérêt à rechercher si la germination se fait, comme chez ce dernier, par un

tube germinatif, ou, comme chez la plupart des Saccharomyces, par un bourgeonnement. Nous avons vu qu'elle se faisait de cette dernière manière.

Des trois espèces traitées dans ce mémoire, le Sacch. cerevisiæ I est la seule qui se laisse ranger dans le cadre établi, en 1870, par M. Reess pour le genre Saccharomyces. Le Sacch. anomalus et le Sacch. Ludwigii occupent des places à part, le premier à cause de la forme particulière de ses spores, et le second par suite du mode de germination de ses spores, qui diffère de tous les autres. Cette dernière espèce présente en outre une autre particularité importante, à savoir la manière spéciale dont les cellules de levûre se détachent de la cellule mère. Elle est également une de celles chez qui j'ai constaté une formation de mycelium. Malgré tout cela, il convient cependant de rapporter provisoirement ces deux espèces au genre Saccharomyces, mais comme représentants de groupes particuliers. Nous avons vu que les recherches exposées dans ce mémoire donnent, sur plusieurs points, des renseignements nouveaux sur la morphologie et l'évolution, et ouvrent la perspective d'en obtenir encore d'autres; c'est pourquoi il ne saurait convenir, à notre point de vue actuel, d'introduire de nouveaux noms génériques.

C'est surtout par rapport au Sacch. Ludwigii que se pose la question de savoir s'il ne pourrait pas appartenir au cycle d'évolution d'un champignon supérieur. Tous ceux qui se sont occupés de l'histoire de la mycologie savent que, bien des fois, avec des intervalles, a été émise l'assertion que les Saccharomyces ne sont pas des espèces indépendantes, mais représentent seulement une phase du développement d'autres espèces; on a fait à ce sujet tantôt une hypothèse, tantôt une autre. Après que Bail, Hoffmann et Berkeley, en particulier, ont, il y a trente ans, soutenu l'opinion que les Saccharomyces devaient appartenir aux moisissures, la même idée, quoique sous une forme un peu différente, a été reprise par M. Pasteur (1876), M. Sachs (1882) et récemment par M. Brefeld. Cependant il n'a été donné aucune preuve de l'inexactitude de notre vieille manière de voir à ce sujet, ni aucun renseignement sur les moyens de trouver ces premiers parents cherchés avec tant de zèle. Une des causes principales de la confusion qui n'a pas tardé à se produire, c'est que, dans beaucoup de cas, on n'a pas distingué entre les vrais Saccharomyces (cellules de levûre à spores endogènes) et les nombreuses formes qui se multiplient, il est vrai, par bourgeonnement comme les précédentes, mais qui, à la différence de ces dernières, ne peuvent développer de spores dans leur intérieur. Par les vieilles recherches de Bail (1857), de Tulasne (1863), de De Bary (1866) et de Reess (1870),

nous savons déjà que ces Non-Saccharomyces appartiennent à diverses parties du système; mais ici, où il s'agit exclusivement des vrais Saccharomyces, ils n'ont pour nous aucun intérêt.

Les seuls faits qui, pour le moment, puissent faire supposer que les vrais Saccharomyces ne sont peut-être pas des espèces indépendantes, sont dus à mes cultures. J'ai démontré par elles, dans ces dernières années, que non seulement le Sacch. Ludwigii, mais aussi d'autres espèces, peuvent développer un mycélium typique. Ces résultats et d'autres encore qu'ont donnés mes recherches, sont bien d'une nature telle que nous ne pouvons maintenir plus longtemps la définition que M. Reess a donnée du genre, mais ils ne nous forcent nullement à l'abandonner complètement, et encore moins à admettre que les Saccharomyces ne sont que des formes du développement d'autres champignons supérieurs. On a, d'un côté et d'autre, beaucoup discuté et écrit sur ces questions. De pareilles discussions dans le vaste champ des possibilités pouvaient, il y a quelques années, avoir encore quelque valeur, mais ce n'est plus le cas. Maintenant, nous ne demandons dans ce domaine que des faits et des preuves exactes.

Décembre 1890.

# Sur la choline comme élément de la bière.

Par

**J. Kjeldahl.**

---

Quand on ajoute à du moût ou à de la bière une petite quantité d'une solution d'iode dans l'iodure de potassium, il se produit un précipité brun rougeâtre extrêmement divisé, qui se dépose très lentement, ne se laisse guère filtrer et, en somme, ne se prête pas à un examen plus approfondi. Il se compose sans aucun doute de combinaisons d'iode et de substances albuminoïdes. Mais si l'on ajoute la solution d'iode en grand excès, il se dépose au bout de peu de temps une assez grande quantité de magnifiques aiguilles cristallines ayant le brillant de la cantharide. Cette réaction peut se faire avec quelques gouttes de bière, même si celle-ci est étendue d'un grand nombre de fois son volume d'eau. La combinaison ainsi produite est par suite complètement insoluble dans l'iodure de potassium iodé; par contre, elle est un peu soluble dans l'eau pure. Chauffée dans l'eau, elle fond à 49° et se prend par le refroidissement en une masse cristalline.

Il y avait tout lieu de croire que cette combinaison était un periodure d'une base organique et, parmi celles-ci, l'attention devait surtout se porter sur la choline, comme étant un produit de la décomposition de la lécithine, qui est si répandue dans tous les organes des animaux et des végétaux. Mais la description que plusieurs auteurs ont donnée du periodure de choline ne peut s'appliquer à la combinaison dont il s'agit. MM. Griess et Harrow[1]) ont ainsi constaté dans le houblon l'existence d'une petite quantité de choline (environ 1 : 5000), en précipitant par l'iodure de potassium

---

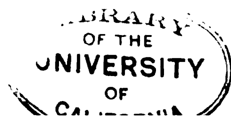
[1]) Journal of the Chemical Society, 1885, p. 298.

iodé la base de l'extrait aqueux. Maîs le periodure décrit par eux était bitumineux et n'avait par conséquent aucune ressemblance avec celui qui nous occupe. D'après M. Brieger[1]), le chlorure de choline donne avec l'iodure de potassium iodé un précipité brun granulé.

Pour vérifier cette réaction, j'ai préparé du chlorure de choline par le procédé suivant de M. Diakonow: 10 jaunes d'œufs sont épuisés par l'éther et ensuite par l'alcool absolu, à 40—50°, et après avoir distillé les extraits, on fait bouillir ensemble les 2 résidus dans de l'eau de baryte concentrée pendant une heure. Après filtration, on précipite la baryte par l'acide carbonique, puis évapore à siccité le liquide filtré et épuise le résidu par l'alcool absolu. La solution alcoolique est enfin précipitée par une solution d'acide chloroplatinique dans l'alcool absolu, le sel de platine, dissous dans l'eau et le platine, précipité par l'acide sulfhydrique. La solution de chlorure de choline ainsi obtenue se comporte vis-à-vis de l'iodure de potassium iodé comme il a été dit plus haut, car même après une très forte dilution (1 : 400000), elle donne un précipité cristallin qui ressemble complètement à celui que nous avons décrit et, entre autres, a aussi la même point de fusion. On trouvera cette combinaison traitée plus au long dans le mémoire suivant sur la choline et ses homologues, de M. R. Koefoed, qui arrive à ce résultat que c'est un ennéaiodure ayant pour formule $N(CH_3)_3 C_2H_4 OH. I. I_8$. On y trouvera également une communication sur le periodure liquide, qui naît facilement de l'ennéaiodure et semble être un pentaiodure, en général cependant avec un excès d'iode.

Après avoir ainsi constaté dans le moût et dans la bière l'existence de la choline, je me suis occupé d'isoler ce produit. Bien que la précipitation par la solution d'iode pût se faire directement dans le moût, il convenait cependant, à cause de la quantité très considérable d'iode qu'il aurait fallu employer, de préparer une solution qui fût relativement plus riche en choline et moins mélangée d'autres substances. J'ai donc fait évaporer quelques litres de moût non houblonné jusqu'à ce qu'il fût réduit de moitié environ, et, après complet refroidissement, y ai ajouté d'abord du lait de chaux en excès et, immédiatement après, un volume d'alcool égal à 1—2 fois celui du mélange. Les hydrates de carbone se précipitent alors presque en entier. La solution alcoolique est ensuite filtrée, puis rendue légèrement acide avec de l'acide sulfurique et, après addition de carbonate de baryte, évaporée au bain-marie jusqu'à ce que tout l'alcool ait disparu. La solution filtrée renferme alors, avec toute la choline, des produits de décomposition de substances

[1]) Untersuchungen über Ptomaïne, I, p. 38.



albuminoïdes et d'autres éléments en petites quantités, et se prête parfaitement à la précipitation par la solution d'iode. Cependant il ne faut pas y procéder dans une solution si concentrée, car il se formerait un iodure bitumineux qui présenterait des difficultés dans le traitement qui suit. Mais cette solution, même après avoir été étendue d'un grand nombre de fois son volume d'eau, donne un très beau précipité de periodure, de même que la quantité d'iode nécessaire pour précipiter complètement la choline semble être bien moindre que celle qu'aurait exigée la précipitation dans le moût primitif. Le periodure est lavé avec aussi peu d'eau que possible et décomposé ensuite avec une solution aqueuse d'acide sulfureux. Si l'on en ajoute tout de suite un excès, le periodure se décompose aussitôt; mais en l'ajoutant par petites portions, il fond, et il faut après chaque addition d'acide sulfureux, chauffer la solution jusqu'à ce qu'elle brunisse de nouveau, le periodure liquéfié n'étant naturellement pas si vite influencé. On introduit alors dans la solution filtrée du chlore au lieu d'iode, en la secouant avec du chlorure d'argent fraîchement précipité; mais auparavant elle doit être neutralisée aussi exactement que possible, car la réaction devient par là bien plus facile et on emploie moins de chlorure d'argent. On reconnaît qu'elle est terminée quand une petite portion filtrée ne prend plus une coloration foncée en étant chauffée avec de l'acide chloroplatinique. Le liquide filtré est ensuite évaporé à siccité et le résidu épuisé par l'alcool absolu bouillant. Après refroidissement, cet extrait est précipité par une solution alcoolique d'acide chloroplatinique. Le sel de platine est lavé avec de l'alcool absolu, puis dissous dans l'eau, et le platine est précipité par un courant d'hydrogène sulfuré prolongé pendant plusieurs heures. Le liquide filtré est chauffé jusqu'à disparition complète de l'hydrogène sulfuré, après quoi on le neutralise et l'évapore pour le réduire à un petit volume. Il se sépare encore quelques flocons bruns qu'on filtre. En y ajoutant alors du chlorure aurique, le chloraurate difficilement soluble et si caractéristique pour la choline ne tarde pas à cristalliser, et la cristallisation est très activée par le refroidissement. Le sel est encore dissous dans l'eau chaude, et après avoir recueilli sur un filtre le peu d'or qui se sépare, on évapore de nouveau pour le faire cristalliser. Les cristaux sont rassemblés sur un filtre de pierre ponce, lavés avec aussi peu d'eau que possible et séchés dans un courant d'air sec sur le filtre. Après être restés 2 jours dans une cloche sur $H_2SO_4$, ils n'ont pas changé de poids. Il importe, avant d'ajouter le chlorure aurique, d'évaporer jusqu'à ce que le précipité brun mentionné plus haut se soit séparé, car avant ce moment le chloraurate

cristallise très difficilement. L'or a été déterminé dans 3 échantillons en chauffant le sel au rouge.

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| I. | 0,3890 gr. du sel d'or ont donné | 0,1725 gr. | d'or, env: | 44,35 % |
| II. | 0,4405 - — — | 0,1914 - | — | 44,45 - |
| III. | 0,6402 - — — | 0,2842 - | — | 44,40 - |

(calculé pour le chloraurate de choline, $C_5 H_{14} NO. Au Cl_4$: 44,44% d'or).

L'identité de la base extraite du moût de bière avec la choline peut donc être regardée comme suffisamment établie.

Je mentionnerai maintenant en peu de mots quelques-unes de mes déterminations quantitatives de la choline. Il importait tout d'abord de s'assurer si la choline était complètement précipitée par la solution alcoolique de $H_2 Pt Cl_6$. Dans ce but, j'ai évaporé à siccité le liquide filtré provenant d'une pareille précipitation et, après avoir dissous le résidu dans l'eau, précipité le platine par l'hydrogène sulfuré. Le liquide filtré, une fois débarrassé de ce dernier par l'ébullition, a été étendu d'eau et mélangé avec la solution d'iode. Même après un repos de 24 heures, il n'a été observé aucune trace de cristaux; la précipitation par $H_2 Pt Cl_6$ est donc complète.

La proportion de la choline dans la bière et le moût a été évaluée à environ 1 décigr. par litre, autant qu'on en pouvait juger par la quantité de periodure comparée à celle qui a été obtenue dans des solutions de choline d'une composition connue. 2 cent. cub. d'une solution de chlorure de choline renfermant 0,0753 gr. de choline, ont été étendus jusqu'à un volume de 750 cent. cub., et devaient ainsi représenter une solution de choline ayant à peu près la même concentration que le moût. On précipite cette solution par 60 cent. cub. d'une solution d'iode qui, de même que celle dont on s'est servi dans toutes les expériences qui suivent, est préparée en dissolvant 1 partie d'iode dans $1^1/_2$ partie d'iodure de potassium et un peu d'eau; quand tout l'iode est dissous, on ajoute de l'eau jusqu'à ce qu'on ait en tout 10 parties. Le periodure est peu après recueilli sur un filtre d'asbeste, lavé avec une solution d'iode étendue et décomposé par l'acide sulfureux; la solution est ensuite neutralisée, puis traitée par le chlorure d'argent et, après filtration, évaporée à siccité; quant au résidu, il est épuisé par l'alcool absolu et l'extrait est précipité par nne solution alcoolique de $H_2 Pt Cl_6$. En calcinant le sel de platine, j'ai trouvé dans 2 analyses

I. 0,0593 Pt = 0,0736 choline
II. 0,0638 - = 0,0792 —

Moyenne = 0,0764 choline
au lieu de 0,0753

Il résulte de là que la choline, par une précipitation sous forme de periodure, se laisse déterminer avec une exactitude suffisante même dans des solutions très étendues.

Mais en opérant directement sur le moût et la bière, il faut employer un bien plus grand excès d'iode pour que la précipitation soit complète. En général, il faut mélanger le liquide qui doit être l'objet de cette recherche avec son volume d'une solution d'iode ayant la composition ci-dessus indiquée. Le periodure est filtré le lendemain et lavé avec 10 cent. cub. d'une solution d'iode étendue de 90 cent. cub. d'eau. Il est ensuite, par la méthode décrite plus haut, transformé en un sel de platine qui est pesé après dessication à 100°. D'ordinaire, on a comme contrôle dissous le précipité dans l'eau sur le filtre, puis évaporé la solution dans une capsule de platine et séché le résidu à 100°. Le poids du sel de platine était alors le même que sur le filtre, quelquefois avec 1 millig. en moins. Quand la calcination est faite avec soin, il doit rester 31,63 % de platine. Le plus souvent on trouvait des nombres qui s'accordaient avec ce chiffre, mais il arrivait de temps à autre que la teneur en platine était trop forte. Cela est peut-être dû à la présence de la combinaison correspondante de triméthylamine $[N(CH_3)_3H]_2PtCl_6$, qui donne 36,91 % de platine. Comme, à cause de la grande consommation d'iode, on ne pouvait guère opérer sur un grand volume de moût, j'ai essayé d'apporter ici à la méthode la même modification que j'avais employée pour constater la présence de la choline, à savoir la précipitation des hydrates de carbone par un lait de chaux et l'alcool. Le lait de chaux dont je me suis servi renfermait 15 gr. de $CaO$ par 100 gr. Par des motifs qui ressortent de ce qui suit, on a veillé à ce que l'addition de l'alcool eût lieu aussitôt que possible, après que le lait de chaux avait été mélangé avec le moût évaporé et puis fortement refroidi. Le précipité volumineux qui se forme alors devient bientôt friable sous l'action de l'alcool, et il se laisse ensuite facilement diviser et laver avec de l'alcool étendu, lorsqu'on emploie un filtre convenable. En opérant ainsi, on obtient une solution débarrassée de la plupart des substances qui, avec la choline, sont précipitées par l'iode. Par contre, il faut éviter, comme nous l'avons déjà dit, d'employer une solution plus concentrée, car on obtient alors un periodure plus ou moins bitumineux qui résiste longtemps à l'action de l'acide sulfureux. J'ai même trouvé utile, après avoir fait évaporer les restes de l'alcool et séparé par filtration les sels de baryte, d'étendre la solution au même volume que le moût primitif. Elle n'en a pas moins été complètement précipitée par une quantité d'iode bien moindre, et le précipité était formé de très beaux cristaux.

50 cent. cub. de moût de 14,4 Vol. °/o Blg. (moût A) ont donné par ce procédé 0,0160 gr. du sel de platine, correspondant à 0,0063 gr. de choline dans 50 cent. cub. (100 du sel de platine = 39,34 de choline) ou à 0,126 gr. par litre.

300 cent. cub. du même moût ont été évaporés au 1/3—1/4 de leur volume et, après refroidissement dans de la glace, mélangés avec 60 cent. cub. d'un lait de chaux ayant la composition indiquée plus haut, et suivi aussitôt d'une addition de 140 gr. d'alcool. Le liquide filtré, après évaporation de l'alcool, a été étendu d'eau jusqu'à 300 gr. et précipité par 40 cent. cub. de la solution d'iode. On a ensuite fait dissoudre le periodure sur le filtre dans une solution aqueuse chauffée d'acide sulfureux, après l'avoir d'abord lavé avec 100 cent. cub. d'une solution étendue d'iode. Pour la décomposition du periodure, on a employé 40 cent. cub. d'une solution de chlorure d'argent à 5 °/o. On a ainsi obtenu 0,1080 gr. du sel de platine, ce qui a donné 0,0343 gr. de platine (31,8 °/o, calculé 31,63 °/o). A ce chiffre correspondent 0,0425 gr. de choline dans 300 cent. cub. ou 0,142 gr. par litre.

500 cent. cub. du même moût ont donné par le même procédé 0,178 gr. du sel de platine, ce qui correspond à 0,140 gr. de choline par litre.

Un autre moût de 14,6 Vol. °/o Blg. (moût B) a donné par une détermination directe dans 50 cent. cub. 0,133 gr. de choline par litre, et par une détermination dans 300 cent. cub., après précipitation par la chaux, 0,138 gr. par litre.

Dans un troisième moût de 14,3 Vol. °/o Blg. (moût C), on a trouvé respectivement 0,108 et 0,123 gr. par litre.

Dans un moût non houblonné de 21,4 Vol. °/o Blg., on a trouvé respectivement 0,190 et 0,210 gr. par litre.

Un moût houblonné de 14,4 Vol. °/o Blg., donne en moyenne 0,122 gr. de choline par une détermination directe et 0,134 gr. après précipitation par la chaux, ou pour 100000 parties d'extrait respectivement 89 et 98 parties de choline. En opérant sur du moût non houblonné, on trouve aussi pour 100000 parties d'extrait 89 et 98 de choline. La petite quantité de base qu'apporte, suivant Griess et Harrow, la cuisson avec le houblon, n'a donc aucune importance au point de vue quantitatif.

Quoique les déterminations directes s'accordent assez bien avec celles qui sont précédées d'une précipitation par la chaux et l'alcool, on voit cependant que ces dernières ont toujours donné des résultats un peu plus élevés. Mais cette différence devient bien plus marquée quand on laisse reposer pendant 24 heures le moût mélangé de chaux avant d'ajouter l'alcool. On trouve en effet dans ce cas une quantité de

choline qui est environ deux fois plus forte que celle indiquée plus haut. Le traitement est d'ailleurs le même que dans les analyses précédentes, avec la seule différence qu'il faut ajouter un peu plus d'alcool; 300 cent. cub. du moût A ont ainsi donné 0,1923 gr. du sel de platine, correspondant à 0,252 gr. de choline par litre, tandis que B et C ont donné respectivement 0,240 et 0,228 gr. de choline par litre.

Outre la choline libre, le moût renferme donc une quantité presque aussi grande de cette base dans une combinaison qui est décomposée par l'hydrate de chaux à une basse température. Si nous avons affaire ici à la lécithine, qui, elle-même insoluble dans l'eau pure, pourrait peut-être être tenue en dissolution par un des éléments du moût, ou à une combinaison du phosphate de glycérine avec la choline, les acides gras étant déjà éliminés, c'est ce que je ne saurais décider pour le moment.

MM. Schulze et Steiger[1]) ont calculé la quantité de lécithine contenue dans diverses graines en déterminant le phosphore dans l'extrait qui en est donné avec l'éther et l'alcool absolu, et en multipliant par 26 la quantité trouvée de phosphore. En opérant ainsi, ils ont trouvé que l'orge sèche renferme 0,74 % de lécithine. Pour préparer 1 litre de moût de 14,4 Vol. % Blg., il faut environ 230 gr. d'orge sèche qui, d'après M. Schulze, renferment par conséquent 1,70 gr. de lécithine. Dans le moût traité par la chaux pendant 24 heures, on a trouvé environ 0,25 gr. de choline par litre, correspondant à $0,25 \times 6,67 = 1,67$ gr. de lécithine. D'après cela, il faut supposer que toute la lécithine de l'orge se dissout pendant le maltage, bien que décomposée au moins en partie, ce qui se manifeste par la présence de la choline libre dans le moût. Que cette décomposition de la lécithine soit due à l'action d'un ferment, cela n'est guère invraisemblable.

Plusieurs analyses de la bière ont montré que sa teneur en choline était environ la même que celle du moût. Il y avait donc lieu de croire que cette base n'était pas atteinte par la fermentation, mais pour en avoir la certitude, j'ai entrepris une série d'analyses du même moût avant la fermentation, après la fermentation principale et longtemps après que toute fermentation avait cessé. Dans une cuve à fermentation Pasteur d'une contenance de 10 litres environ, on a stérilisé 7 litres de moût de 14,4 Vol. % Blg., et les a laissés reposer pendant 14 jours pour s'assurer que la stérilisation était bien complète, après quoi on en a pris un grand échantillon pour l'analyse. Il a été fait, comme d'habitude, 3 déterminations, la première dans 50 cent. cub. de moût par précipitation directe par l'iode, la deuxième dans 300

[1]) Zeitschr. für physiologische Chemie, 1889, p. 365.

cent. cub. après addition de chaux immédiatement suivie de la précipitation par l'alcool, et la troisième également dans 300 cent. cub. qui sont restés mélangés avec la chaux 24 heures avant l'addition de l'alcool. La quantité de choline calculée par litre est indiquée dans la première ligne horizontale du tableau ci-dessous I a, b, c. Le moût a alors été infecté de la levûre n° 1 de Carlsberg et mis à fermenter dans une pièce chauffée. 6 jours plus tard, le sacchomètre indiquait 4,03 % Blg. et 2 jours après 3,90 %. On en a alors pris de nouveau un grand échantillon, et après expulsion de l'acide carbonique et filtration du moût, on a fait 3 analyses analogues II a, b, c. Après un nouveau repos de 14 jours, par conséquent 22 jours après la mise en levûre, l'atténuation était toujours la même et la fermentation pouvait donc être regardée comme complètement terminée. On a alors procédé aux 3 analyses III a, b, c.

| | | |
|---|---|---|
| I a 0,120 gr. | I b 0,140 gr. | I c 0,249 gr. |
| II a 0,128 - | II b 0,150 - | II c 0,260 - |
| III a 0,116 - | III b 0,145 - | III c 0,260 - |

Comme on voit, il n'y a pas de différence bien marquée entre les 3 séries d'analyses. L'extrait de bière est donc relativement le plus riche en choline; d'après les analyses, il en renferme la proportion notable de 1/2 % (libre et combiné). La quantité totale de cette base contenue dans un litre de bière est à peu près la même que dans un œuf de poule.

# Quelques observations sur la choline et ses homologues.

Par

**R. Koefoed.**

Les recherches faites dans les dernières années ont montré que, parmi les combinaisons organiques azotées qu'on rencontre le plus fréquemment dans le monde animal et le monde végétal, la choline occupe une place assez importante, et il est par suite aussi vraisemblable, qu'elle joue, au point de vue physiologique, un rôle intermédiaire non moins important dans les transformations des matières azotées.

Cela suffirait déjà pour motiver une étude plus approfondie des caractères chimiques de la choline, et cela d'autant plus que les observations que nous possédons sur cette base sont peu nombreuses et peu étendues; il est, il est vrai, bien établi que la choline appartient à un groupe de combinaisons, les bases quaternaires de l'ammonium, qui ont été complètement caractérisées par les brillants travaux de M. A. W. Hofmann, l'auteur de leur découverte; mais, sur la choline elle-même, il n'existe que quelques observations éparses. Il y a en outre une autre circonstance qui doit engager à entreprendre une pareille étude, à savoir qu'on trouve dans la nature, avec la choline, des combinaisons analogues — peut-être ses homologues — qui, par leurs caractères chimiques, sont tellement voisines de cette base qu'en se basant sur les faits connus jusqu'ici, on n'est pas en état de les séparer ni de les individualiser.

D'après les considérations qui précèdent, une étude chimique de la choline se divise naturellement en deux parties; il y aura à chercher, d'une part, comment la choline se comporte sous l'action d'autres substances, et, de l'autre, si, parmi les observations ainsi recueillies, il

y en a qui caractérisent spécialement la choline elle-même, ou si elles doivent toutes, plus ou moins, être regardées comme particulières au groupe entier des bases quaternaires de l'ammonium, et par conséquent, ne fournissent pas directement les moyens de séparer les différents membres du groupe.

Dans ce qui suit, je communique quelques recherches que j'ai faites en vue de ce double objet, mais qui ont dû être subitement interrompues, de sorte qu'elles n'ont pas atteint complètement leur but, et ont pris un caractère plus fragmentaire que je ne l'avais projeté.

---

Comme nous l'avons dit, la choline appartient aux bases quaternaires de l'ammonium, ce groupe de combinaisons organiques azotées qui sont considérées comme des produits de substitution de l'hydroxyde hypothétique d'ammonium $H_4\overset{v}{N}.OH$, où les quatre atomes d'hydrogène combinés avec l'azote sont remplacés par des radicaux alcooliques; la forme générale du radical quaternaire d'ammonium sera donc, en désignant par R le radical alcoolique monovalent, $R_4\overset{v}{N}$, et on voit qu'on peut se figurer — et elles existent aussi en réalité — un nombre très considérable de pareilles combinaisons.

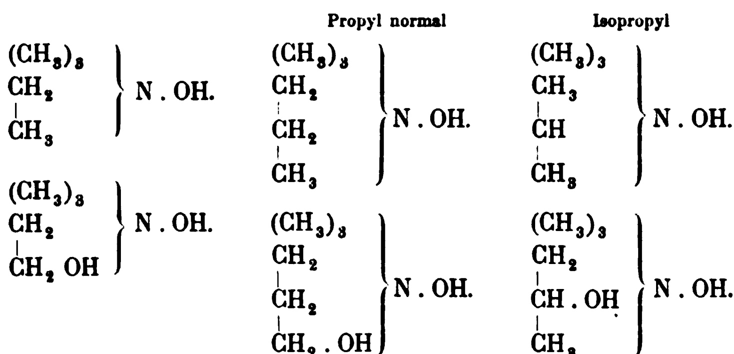
D'après les recherches de MM. A. Strecker[1]), O. Liebreich[2]), A. Baeyer[3]), A. Wurtz[4]), E. Harnack[5]), E. Harnack et Schmiedeberg[6]), parmi lesquels Wurtz a fait la synthèse de la choline, on doit regarder comme établi que la choline est un hydroxyde d'ammonium, dans lequel 3 groupes de méthyle sont substitués à 3 atomes d'hydrogène, et le groupe d'oxéthyle, $C_2H_4.OH$, au quatrième atome d'hydrogène, de sorte que la formule de la choline devient $(CH_3)_3\ (C_2H_4\ .\ OH)$, $\overset{v}{N}.OH$. Nous devons ici faire observer que, tandis qu'il régnait auparavant quelque incertitude dans l'emploi de la dénomination de choline, car on confondait les noms de choline et de neurine, le premier de ces noms désigne maintenant exclusivement la combinaison d'oxéthyltriméthylammonium, et le second, la base trouvée par Liebreich (l. c.),

---

1) Liebigs Ann. 123, p. 355; 1862.
2) Ibid. 134, p. 29; 1865.
3) Ibid. 140, p. 306, 1866; 142, p. 322, 1867.
4) Ibid. Supplément 6, p. 116 et 197, 1868.
5) Archiv f. experiment. Pathologie 4, p. 168, 1876.
6) Ibid. 6, p. 104, 1876.
7) L. Brieger, Untersuch. über Ptomaine, 1885—86.

le Vinyltriméthylammonium, $(CH_3)_3 (C_2 H_3) \overset{\blacktriangledown}{N} . OH$ [7]). Relativement aux choix à faire parmi les nombreuses combinaisons analogues pour les comparer avec la choline, il était naturel de prendre, d'une part, la base dont la choline est à considérer comme l'oxybase, à savoir l'hydrate de triméthyléthylammonium $(CH_3)_3 (C_2 H_5) \overset{\blacktriangledown}{N} . OH$, et, de l'autre, le seconde terme de la même série, à savoir l'hydrate de triméthylpropylammonium avec son oxybase et les combinaisons isomères correspondantes.

Nous aurons ainsi à examiner les combinaisons suivantes:



et cet examen présentera encore un autre intérêt, car une comparaison entre ces différentes combinaisons montrera, d'un côté, le rôle que joue la substitution d'un groupe de méthyle ($CH_3$—) à un atome d'hydrogène, que cette substitution se fasse dans la formation d'une combinaison normale ou isomère, et, de l'autre, l'influence que la formation d'un groupe d'hydroxyle, au lieu d'un atome d'hydrogène, exerce sur les caractères chimiques et physiques des combinaisons; enfin, la manière dont les combinaisons isomères se comportent vis-à-vis des oxydants semble aussi pouvoir offrir quelque intérêt.

Pour préparer les chlorures des bases, dont provisoirement quatre seulement ont été étudiés, à savoir:

| | | |
|---|---|---|
| le chlorure | d'éthyltriméthylammonium | |
| — | d'oxéthyl | — — — |
| — | d'isopropyl | — — — |
| — | d'isooxypropyl | — — — |

nous avons employé la solution aqueuse de triméthylamine de Kahlbaum à 33 %, et procédé comme il suit.

### I. Chlorure d'éthyltriméthylammonium.

40 gr. d'iodure d'éthyle (point d'ébullition 71°,9 à la pression de 761$^{mm}$) préparé par la méthode de M. A. W. Hofmann[1]), en faisant réagir l'un sur l'autre de l'alcool éthylique et de l'iode à l'aide du phosphore ordinaire, sont introduits dans 3 tubes de verre avec un petit excès de la solution de triméthylamine à 33% (calculé 45 gr.), et assez d'alcool absolu pour que l'iodure d'éthyle se dissolve, et ces tubes sont fermés à la lampe et chauffés pendant 24 h. au bain-marie. Le contenu des tubes est concentré au bain-marie et on le laisse ensuite cristalliser; les cristaux sont recueillis sur un filtre, lavés avec de l'alcool absolu et séchés dans le vide. En prolongeant l'évaporation, l'eau-mère donne encore quelques cristaux légèrement colorés en jaune, mais qui deviennent blancs par le lavage avec l'alcool. Après le séchage dans le vide, j'ai trouvé les résultats suivants:

0,513 gr. d'iodure ont donné par la méthode de M. Kjeldahl 33 milligr. N.

0,227 gr. d'iodure ont demandé 10,55 $^{cent. cub.}$ d'une solution normale de $AgNO_3$ à $^1/_{10}$ = 0,1335 gr. J.

| Calculé | Trouvé |
|---|---|
| 6,54 % N | 6,43 % |
| 59,02 % J | 58,90 % |

On a transformé l'iodure en chlorure en le dissolvant dans l'eau et le traitant par ûn grand excès de chlorure d'argent.

### II. Chlorure d'oxéthyltriméthylammonium.

On extrait cette combinaison de matières animales renfermant de la choline (jaunes d'œufs, cervelles de bœufs), ou l'obtient directement par synthèse. Pour extraire la choline des jaunes d'œufs, j'ai employé la méthode de M. Diakonow[2]), en épuisant les jaunes d'œufs d'abord par l'éther et puis par l'alcool; les deux solutions sont évaporées et le résidu est chauffé avec de l'eau de baryte, qui met la choline en liberté. Après filtration, la baryte en excès est précipitée par $CO^2$, le liquide filtré, évaporé, et le résidu épuisé par l'alcool absolu; la solution ainsi obtenue est enfin précipitée par le chlorure de platine, après quoi on purifie successivement le chloroplatinate de choline ainsi formé par une nouvelle cristallisation, un traitement par

[1]) Liebigs Ann. 115, p. 272.

[2]) Jahresbericht d. Chemie, 1867, p. 776.

l'acide azotique très dilué (d'après Schmiedeberg et Harnack, l. c.) et une dernière cristallisation. Le chlorure s'obti enten décomposant le sel double de platine par l'hydrogène sulfuré.

Pour extraire la choline des cervelles de bœuf, j'ai suivi en partie le même procédé, en partie la méthode indiquée par M. L. Brieger[1]), d'après laquelle on fait bouillir dans de l'acide chlorhydrique concentré la masse cérébrale préalablement bien lavée et hachée très fin, et évapore après filtration la solution au bain-marie; le résidu est épuisé par l'alcool et la solution alcoolique traitée par une solution alcoolique de chlorure de mercure, qui précipite la choline à l'état de chloromercurate de choline, sel qui est ensuite purifié par une nouvelle cristallisation et décomposé par l'hydrogène sulfuré.

Comme il a été dit plus haut, c'est à M. Wurtz qu'est due la synthèse de la choline[2]). On y arrive en chauffant au bain-marie, dans un tube fermé à la lampe, de la chlorhydrine d'éthylène (point d'ébullition 128° à la pression de $760^{mm}$) avec la quantité calculée de la solution de triméthylamine à 33 %. La chlorhydrine employée avait, par le procédé de M. Ladenburg[3]), été préparée à l'aide du glycol éthylénique obtenu en faisant bouillir du bromure d'éthylène dans de l'eau additionnée de carbonate de potasse, suivant la méthode de MM. A. Zeller et G. Hüfner[4]). Cette synthèse donne de très bons résultats, et en laissant reposer le contenu du tube dans une cloche sur $H_2SO_4$, on obtient de belles aiguilles cristallines, longues de 2—3 centimètres, de chlorure de choline complètement pur. L'eau-mère a donné encore une certaine quantité de chlorure, et la dernière eau-mère traitée par le chlorure de mercure a laissé déposer un précipité de chloromercurate de choline.

### III. Chlorure d'isopropyltriméthylammonium.

L'iodure de cette combinaison s'obtient absolument de la même manière que l'iodure d'éthyltriméthylammonium, en chauffant au bain-marie, dans des tubes fermés à la lampe, de l'iodure d'isopropyle avec un petit excès d'une solution de triméthylamine à 33 % et une addition d'alcool suffisante pour faire dissoudre l'iodure d'isopropyle; cette addition d'alcool active beaucoup la réaction en mettant les éléments en contact plus intime les uns avec les autres, et n'influe pas d'ailleurs

[1]) Weitere Untersuchungen uber Ptomaine p. 55.
[2]) Liebigs Ann. Supplément 6, p. 116.
[3]) Berichte d. d. ch. Ges. Bd. 16, p. 1407.
[4]) Journal f. pr. Chemie, Bd. 119, p. 225.

sur le processus. L'iodure d'isopropyle employé a été préparé suivant la méthode de M. W. Markovnikoff[1]), en introduisant dans un ballon 200 gr. de glycérine (densité 1,25), 300 gr. d'iode et 160 gr. d'eau, auxquels on ajoute ensuite 55 gr. de phosphore ordinaire; après avoir laissé le liquide reposer quelque temps, on en a distillé 250 gr. bouillant entre 80 et 100°; le produit distillé a été lavé avec du carbonate de soude et déshydraté par le chlorure de calcium, après quoi une rectification a donné 200 gr. d'un produit bouillant entre 89,5 et 90°,5, qu'on a saturé d'acide iodhydrique gazeux[2]) et distillé au bout de 24 heures en recueillant tout ce qui passait entre 85 et 90°. Le produit, après avoir été lavé avec du carbonate de soude et déshydraté par le chlorure de calcium, a été distillé dans le déflegmateur de M. Thomsen, et on a ainsi obtenu 175 gr. d'un dernier produit bouillant à 89°,5 (à la pression de $756^{mm}$).

Le contenu des tubes, qui, à leur ouverture, présentait un léger excès de pression, a été évaporé dans le vide à la température ordinaire et le résidu cristallin, desséché; 40 gr. d'iodure d'isopropyle et 50 gr. de la solution de triméthylamine à 33 % ont ainsi donné 51 gr. d'iodure brut. Par une nouvelle cristallisation dans l'alcool on a obtenu des cristaux réguliers, bien développés (formes observées: ∞O∞ et O . ∞O∞) qui sont facilement solubles dans l'eau et l'alcool chaud, plus difficilement dans l'alcool froid, et sont précipités de cette solution par l'éther. Le sel est déliquescent et se colore facilement en brun.

0,4373 gr., cristallisés de nouveau dans l'alcool et séchés dans le vide, ont donné par la méthode de M. Kjeldahl 26,48 milligr. N.

0,2980 gr., cristallisés de nouveau dans l'alcool et séchés dans le vide, ont demandé 13,05 cent. cub. d'une solution normale de $AgNO_3$ à $^1/_{10}$ = 0,1651 gr. J.

| Calculé | | Trouvé |
|---|---|---|
| 6,13 % | N | 6,05 % |
| 55,41 % | J | 55,40 % |

En traitant l'iodure par le chlorure d'argent en excès, on l'a transformé en chlorure.

## IV. Chlorure d'isooxypropyltriméthylammonium.

La chlorhydrine d'isopropylène qui est nécessaire pour la synthèse de cette combinaison a été obtenue en saturant d'acide chlorhydrique

[1]) Liebigs Ann. 138, p. 364.

[2]) L. Meyer, Ber. d. d. ch. Ges. Bd. 20, p. 3881.

le glycol d'isopropylène ordinaire préparé, suivant la méthode de M. A. Belohoubek[1]), par la distillation du glycérinate monosodique. 2000 gr. de glycérine déshydratée ont été mélangés avec 875 gr. de soude hydratée, et on a distillé ce mélange en 8 portions dans une cornue en fer, et chaque fois aussi longtemps qu'il passait quelque chose. Des produits réunis de la distillation, pesant 1150 gr., on a séparé le glycol de propylène en les secouant avec de l'éther et, après rectification, on a obtenu 150 gr. de glycol propylénique, bouillant à 187—189°, qu'on a saturés pendant 22 heures de gaz chlorhydrique sec, comme l'indique M. Ozer[2]). Après distillation, lavage avec du carbonate de soude, déshydratation et rectification, on a obtenu 51 gr. de chlorhydrine d'isopropylène bouillant à 127°. La chlorhydrine a été renfermée dans des tubes avec la quantité calculée de la solution de triméthylamine à 33 %, et maintenue pendant 18 heures dans de l'eau bouillante, après quoi le contenu des tubes a, par évaporation dans une cloche sur $H_2SO_4$, laissé déposer en abondance des cristaux de chlorure d'isooxypropyltriméthylammonium.

---

Avec les sels haloïdes ainsi obtenus des 4 bases, j'ai cherché à préparer quelques combinaisons caractéristiques, notamment des combinaisons doubles de sels métalliques, comme on le verra dans l'exposé suivant, qui contient les principaux résultats auxquels j'étais arrivé quand ces recherches ont été interrompues.

Pour faciliter la comparaison entre les caractères des différentes bases, les résultats sont groupés de manière que les combinaisons qui se correspondent sont traitées ensemble, ou plutôt de façon à mettre bien en évidence comment les différents réactifs se comportent vis-à-vis des différentes bases. Comme nous l'avons vu, les bases quaternaires de l'ammonium constituent un groupe bien caractérisé, dont les membres se comportent d'une manière analogue à l'égard de certaines substances qui, par conséquent, sont considérées comme des réactifs de tout le groupe; parmi ces réactifs, figurent en première ligne l'acide chloroplatinique, l'acide chloraurique, le chlorure de mercure, l'iodure de mercure (dissous dans l'iodure de potassium) et l'iode (dissous dans l'iodure de potassium), et, dans les recherches qui suivent, j'ai surtout étudié l'action de ces réactifs sur les bases, car ce sont les combinaisons ainsi obtenues qui ont été l'objet de mes recherches.

---

[1]) Berichte d. d. ch. Ges. 12, p. 1872.
[2]) Liebigs Ann. Supplément I, p. 254.

**A. Chlorures doubles de platine.**

Chloroplatinate d'éthyltriméthylammonium.

$[(CH_3)_3 (C_2 H_5) N]_2 . Pt Cl_6 = 582,24$. Par l'évaporation des solutions réunies des deux chlorures, le sel cristallise en cristaux réguliers rouge jaunâtre anhydres[1]), qui sont facilement solubles dans l'eau et insolubles dans l'alcool et l'éther.

L'analyse de cette combinaison a donné les résultats suivants:

0,4118 gr., séchés à 110°, ont donné 0,4110 gr., qui ont laissé 0,1368 gr. Pt.
0,501 gr. — — — 0,500 gr. qui, par la méthode de M. Kjeldahl, ont donné 23,75 milligr. N.

| Calculé | Trouvé |
|---|---|
| 33,37 °/o Pt | 33,29 °/o |
| 4,81 °/o N | 4,75 °/o |

L'azote de ces combinaisons se laisse très facilement déterminer par la méthode de M. Kjeldahl, mais il faut les faire bouillir longtemps avec l'acide sulfurique; dans toutes ces analyses, la durée de l'ébullition a varié entre 8 et 12 heures. En ce qui concerne les combinaisons du platine, ce métal a été précipité par le zinc avant la distillation avec la soude, et, quant aux combinaisons à base de mercure, on a précipité ce dernier par le sulfate de protoxyde de fer, et évité ainsi la formation de combinaisons métalliques ammoniacales qui ne se laissent pas décomposer par la soude.

Chloroplatinate d'oxéthyltriméthylammonium.

$[(CH_3)_3 (C_2 H_4 . OH) N]_2 . Pt Cl_6 = 614,16$. Le chloroplatinate de choline forme une combinaison facilement soluble dans l'eau, insoluble dans l'alcool et l'éther, et qui est dimorphe et peut-être même trimorphe[2]), car, par le refroidissement d'une solution saturée chaude, le sel cristallise en grands prismes orangés à 6 faces, tandis que, par l'évaporation spontanée d'une solution saturée à la température ordinaire, on l'obtient en grandes tables rhomboédriques rouge jaunâtre. M. Hundeshagen a observé que, par le refroidissement d'une solution chaude saturée renfermant 15 °/o d'alcool environ, le sel cristallise en octaèdres, mais je n'ai pas réussi à produire cette cristallisation. On a voulu voir dans ce dimorphisme la preuve que la choline naturelle ne serait pas identique à celle qui est obtenue par synthèse, mais il n'y a sous ce rapport aucune différence, car les deux sels des platine peuvent être dimorphes. M. Brieger[3]) mentionne que le sel de platine de la

[1]) Topsøe, Overs. over Vidsk. Selskabs Forhandlinger 1882, p. 94.
[2]) Hundeshagen, J. f. pr. Ch. Bd. 136, p. 245.
[3]) Untersuch. über Ptomaine. I. p. 37.

choline naturelle devient fortement électrique par le frottement, tandis que celui de la choline artificielle ne jouirait pas de cette propriété, mais cette observation n'est guère exacte; en tout cas, j'ai constaté que le sel de platine de la choline artificielle broyé à l'état sec dans un mortier de porcelaine s'est montré électrique, tandis que le sel de platine de la choline naturelle n'a manifesté dans les mêmes conditions aucune polarité électrique.

Le sel de platine cristallise à l'état anhydre, mais il a une tendance à retenir avec ténacité une petite quantité d'eau, qui ne disparaît qu'à 110$^0$, et telle est certainement la cause des résultats assez divergents auxquels on est arrivé auparavant dans les analyses du chloroplatinate de choline[1]).

L'analyse du chloroplatinate de choline dans ses divers modes de préparation, a donné les résultats suivants:

1. Choline préparée par synthèse.

1re cristallisation, prismes provenant d'une solution chaude saturée:

0,3780 gr., séchés à 110$^0$, ont donné 0,3735 gr. sel, qui ont laissé 0,1185 gr. Pt.

0,5225 gr., séchés à 110$^0$, ont donné 0,5200 gr., qui ont donné 23,70 milligr. N par la méthode de M. Kjeldahl.

| Calculé | | Trouvé |
|---|---|---|
| 31,63 % | Pt | 31,56 % |
| 4,56 % | N | 4,55 % |

2e cristallisation, tables rhomboédriques, provenant d'une solution froide saturée:

0,6845 gr., séchés à 110$^0$, ont laissé 0,2165 Pt = 31,63 % Pt.

0,4450 gr., séchés à 110$^0$, ont donné 0,4415 gr., qui ont donné 20 milligr. N = 4,50 % N par la méthode de M. Kjeldahl.

2. Choline extraite de jaunes d'oeufs par la méthode de M. Diakonow.

1re cristallisation.

0,6630 gr. séchés à 110$^0$ ont donné 0,659 gr. sel, qui ont laissé 0,2088 gr. Pt = 31,68 % Pt.

3e cristallisation.

0,5875 gr., séchés à 110$^0$, ont donné 0,5840 gr. sel, qui ont laissé 0,181 gr. Pt = 30,99 % Pt.

0,273 gr., séchés à 110$^0$, ont laissé 0,0847 gr. Pt. = 31 % Pt.

0,498 gr., séchés à 110$^0$, ont laissé 0,495 sel, qui, par la méthode de M. Kjeldahl, ont donné 21,8 milligr. N = 4,40 % N.

[1]) Brieger l. c.

3. Choline extraite de cervelles de boeufs.

Préparée suivant la méthode de M. Brieger à l'aide du chlorure double de mercure.

0,886 gr., séchés à 110°, ont donné 0,881 gr., qui ont laissé 0,2790 gr. Pt. = 31,60 % Pt.

Préparée suivant la méthode de M. Diakonow.

1re cristallisation.

0,433 gr., séchés à 110°, ont donné 0,430 gr., qui ont laissé 0,1355 gr. Pt. = 31,51 % Pt.

2e cristallisation, purifiée par un traitement par l'acide azotique très faible et une nouvelle cristallisation.

0,371 gr., séchés à 110°, ont laissé 0,1155 gr. Pt. = 31,13 % Pt.

On voit par ces résultats que, tandis que le chlorure de choline obtenu par synthèse ou extrait de cervelles de boeufs par la méthode de M. Brieger est pur, il n'y a que le premier produit cristallisé du chlorure de choline extrait des oeufs et des cervelles par le procédé de M. Diakonow qui le soit; les cristallisations ultérieures ont bien un aspect homogène et parfaitement normal, mais elles ont une teneur notablement plus faible en platine et en azote, et il y a par suite lieu de supposer qu'elles renferment des combinaisons doubles de platine d'une ou de plusieurs autres bases et, dans ce cas, peut-être de quelque homologue supérieur de la choline, mais la petite quantité de matière dont on dispose rend très difficile une recherche plus approfondie.

La manière dont le chloroplatinate de choline se comporte vis-à-vis des oxydants a été si bien étudiée par MM. Schmiedeberg et Harnack (l. c.), qu'il n'y a rien à y ajouter; je mentionnerai seulement que des recherches préliminaires semblent montrer que l'eau oxygénée se prête à l'oxydation de ces bases, surtout parce que le rendement des produits de l'oxydation est plus grand que celui de la méthode par l'acide azotique, que ces chimistes ont employée.

Chloroplatinate d'isopropyltriméthylammonium $[(CH_3)_3 (C_3H_7) N]_2 Pt Cl_6$ = 610,18. En mélangeant une solution concentrée de chlorure d'ammonium avec une solution assez concentrée d'acide chloroplatinique, on obtient un précipité cristallin jaune clair qui se dissout quand on le chauffe; par un refroidissement lent de la solution, il se dépose d'assez longues aiguilles tétragonales disposées en forme de gerbes, et en laissant l'eau-mère s'évaporer spontanément, on obtient encore des cristaux tétragonaux jaune rougeâtre bien développés, très facilement solubles dans l'eau chaude, difficilement solubles dans l'eau froide et insolubles dans l'alcool et l'éther.

Voici les résultats de l'analyse:

0,3905 gr. sel n'ont rien perdu au séchage à 110°, et ont laissé 0,1245 Pt.

0,471 gr. sel ont, par la méthode de M. Kjeldahl, donné 21,3 milligr. N.

| Calculé | Trouvé |
|---|---|
| 31,84 % Pt | 31,88 % |
| 4,59 % N | 4,52 % |

Chloroplatinate d'isooxypropyltriméthylammonium $[(CH_3)_3 (C_3 H_6 OH) N]_2 . Pt Cl_6 = 642,10$. Ce chloroplatinate présente extérieurement la ressemblance la plus complète avec la combinaison correspondante de la choline, mais ne semble pas être dimorphe; il cristallise d'une solution saturée à chaud comme d'une solution saturée à la température ordinaire, en laissant déposer de belles tables rhomboédriques rouge jaunâtre, assez facilement solubles dans l'eau, mais insolubles dans l'alcool et l'éther.

Voici les résultats de l'analyse:

0,6585 gr. sel, séchés à 110°, ont donné 0,6570 gr., qui ont laissé 0,1985 Pt.

0,481 gr. sel, séchés à 110°, ont donné 0,480 qui, par la méthode de M. Kjeldahl, ont donné 20,6 milligr. N.

| Calculé | Trouvé |
|---|---|
| 30,26 % Pt | 30,21 % |
| 4,36 % N | 4,29 % |

Pour m'assurer si cet homologue de la choline pouvait, comme celle-ci[1]), être évaporé avec de l'acide chlorhydrique concentré sans se décomposer, j'en ai fait évaporer deux grammes dans 5 cent. cub. de cet acide; après évaporation à siccité, le sel a été délayé dans de l'alcool absolu et lavé avec ce dernier jusqu'à ce que le liquide filtré ne fût plus acide.

0,5115 gr., séchés à 110°, ont donné 0,5100 gr., qui ont laissé 0,1547 gr. Pt. = 30,34 % Pt.

Le reste du sel a de nouveau été évaporé avec 5 cent. cub. d'acide chlorhydrique concentré et traité comme ci-dessus

0,463 gr., séchés à 110°, ont donné 0,461 gr., qui ont laissé 0,1395 gr. Pt. = 30,30 % Pt.,

de sorte que le sel ne semble pas avoir subi aucune décomposition par le traitement avec l'acide chlorhydrique. Par contre, il est décomposé par l'acide azotique concentré; mais je n'ai pas réussi, même approximativement, à terminer ces expériences.

---

[1]) Brieger, l. c. III, 15—16.

**B. Chlorures doubles d'or.**

Tous les sels doubles ici mentionnés qui ont la composition $RAuCl_4$ et qui sont anhydres, ont été préparés en précipitant une solution assez concentrée du chlorure considéré par une quantité un peu plus grande que la normale d'une solution d'acide chloraurique à 5 %; les précipités abondants et presque floconneux ainsi obtenus, qui, sous le microscope, se sont montrés composés de très fines aiguilles, ont été recueillis sur un filtre, lavés avec un peu d'eau froide et puis dissous sur le filtre dans de l'eau bouillante, après quoi on a laissé la solution cristalliser lentement.

Chloraurate d'éthyltriméthylammonium, $RAuCl_4 = 425,44$. On l'obtient par ce procédé sous forme de belles aiguilles jaune paille foncé, longues de ½ centimètre, appartenant au système tétragonal[1]), qui sont difficilement solubles dans l'eau froide et l'alcool froid, plus facilement solubles dans l'eau chaude et l'alcool chaud et insolubles dans l'éther.

0,1980 gr. sel, séchés à 102°, ont donné 0,1978 gr., qui ont laissé 0,0911 gr. Au.

0,3250 gr. sel, séchés à 102°, ont donné 0,3245, qui, par la méthode de M. Kjeldahl, ont donné 10,40 milligr. N.

| Calculé | Trouvé |
|---|---|
| 46,11 % Au | 46,06 % |
| 3,29 % N | 3,21 % |

Chloraurate d'oxéthyltriméthylammonium, $RAuCl_4$ = 441,50. Cristallise en aiguilles monocliniques, qui, comme dans la combinaison précédente, sont jaune paille, mais d'une nuance un peu plus claire. En restant longtemps exposé à la lumière, le sel sec se décompose et il se sépare de l'or.

0,4070 gr., séchés à 102°, ont donné 0,4066 gr., qui ont laissé 0,1805 gr. d'or.

0,387 gr., séchés à 102°, ont donné 12,10 milligr. N par la méthode de M. Kjeldahl.

| Calculé | Trouvé |
|---|---|
| 44,44 % Au | 44,39 % |
| 3,17 % N | 3,13 % |

Le sel est difficilement soluble dans l'eau, mais se dissout bien plus facilement dans l'eau chaude que dans l'eau froide; pour en déterminer la solubilité dans l'eau froide, j'en ai dissous 1 gramme dans de l'eau bouillante et porté le volume de la solution à 25 cent. cub., après quoi

[1]) Topsøe, l. c. p. 96.

celle-ci a été refroidie très lentement dans un bain-marie jusqu'à 17°,5, et j'en ai ensuite déterminé la densité et le contenu en or dans 10 cent. cub. environ.

La densité, prise avec le pycnomètre, était de 1,0071 et 2 analyses m'ont donné les résultats suivants:

10,0585 gr. de la solution ont donné 0,0557 gr. Au, correspondant à 0,1254 gr. de sel dissous dans 9,9331 gr. d'eau.

10,0685 gr. de la solution ont donné 0,0558 gr. Au, correspondant à 0,1256 gr. de sel dissous dans 9,9429 gr. d'eau,

par conséquent 1 partie du sel demande pour se dissoudre 79,2 parties d'eau à 17°,5,

ou 1 molécule du sel demande pour se dissoudre 1947 molécules d'eau à 17°,5.

Le sel est également soluble dens l'alcool, mais plus facilement dans l'alcool chaud que dans l'alcool froid.

Chloraurate d'isopropyltriméthylammonium, $RAuCl_4$ = 439,51. Cristallise en aiguilles jaunes, très difficilement solubles et appartenant au système monoclinique; les cristaux, qu'on obtient par un refroidissement lent d'une solution du sel, sont petits mais parfaitement développés, et présentent en général les combinaisons suivantes: ∞P, ∞P̶ ∞, ∞P̶, parfois avec P et 0P, d'après les notations de Naumann. De même que les combinaisons précédentes, ils sont aussi un peu solubles dans l'alcool. L'analyse a donné les résultats suivants:

0,2135 gr., séchés à 102°, ont donné 0,2130 gr., qui ont laissé 0,0949 gr. Au.

0,3345 gr., séchés à 102°, ont donné 0,3340 gr., qui, par la méthode de M. Kjeldahl, ont donné 10,53 millig. N.

| Calculé | Trouvé |
|---|---|
| 44,64 °/o Au | 44,55 °/o |
| 3,19 °/o N | 3,15 °/o |

Chloraurate d'isooxypropyltriméthylammonium, $RAuCl_4$ = 455,47. Ce sel a une très grande ressemblance avec la combinaison correspondante de la choline, tant sous le rapport de la couleur que de la forme cristalline, mais est un peu plus soluble dans l'eau, comme le montrent les expériences ci-dessous.

0,3740 gr., séchés à 102°, ont donné 0,3730 gr., qui ont laissé 0,1605 gr. Au.

| Calculé | Trouvé |
|---|---|
| 43,07 °/o Au | 43,03 °/o |

On a traité le sel dont il s'agit de la même manière que la combinaison de la choline, en le dissolvant dans l'eau bouillante et faisant refroidir très

lentement la solution jusqu'à 17°,5, après quoi on en a pris 5 cent. cub. pour la détermination de l'or.

| | |
|---|---|
| 5,031 gr. de la solution ont donné 0,0415 gr. Au<br>5,029 gr. — — 0,0410 — | en moyenne 0,04125 gr. Au, correspondant à 0,0955 gr. sel, dissous dans 4,9345 gr. eau. |

1 partie du sel demande donc pour se dissoudre 51,7 parties d'eau à 17°,5, ou 1 molécule du sel, 1310 molécules d'eau à la même température.

### C. Chlorures doubles de mercure.

Chloromercurate d'éthyltriméthylammonium, $RCl, 6HgCl_2 = 1746,47$. Par l'évaporation spontanée d'une solution concentrée contenant un grand excès de RCl, M. Topsøe[1]) a obtenu le sel $2RCl, HgCl_2$, tandis que, par le refroidissement lent d'une solution étendue bouillante de 1 mol. $HgCl_2$ + 2 mol. RCl, il a obtenu la combinaison $RCl, HgCl_2$, et enfin, par le refroidissement lent d'une solution étendue bouillante contenant le même nombre de molécules des deux sels, la combinaison $RCl, 2HgCl_2$.

Si l'on ajoute une solution, même assez étendue, de chlorure d'ammonium à un grand excès d'une solution de chlorure de mercure saturée à la température ordinaire (à 7 °/o environ), il se dépose un lourd précipité blanc cristallin qui se dissout assez facilement dans l'eau chaude et l'alcool chaud, et qui, par le refroidissement lent de la solution aqueuse, cristallise en beaux cristaux d'un blanc éclatant (en apparence hexagonaux).

M. Topsøe a, de deux autres bases quaternaires d'ammonium, préparé des sels auxquels il donne la formule $RCl, 5HgCl_2$, en faisant cependant observer en même temps que la composition peut en être $RCl, 6HgCl_2$, remarque qui s'applique surtout au sel de tétraméthylammonium. M. Topsøe fait dépendre la question de savoir si le sel double renferme 5 ou 6 molécules de chlorure de mercure de la détermination du mercure et du chlore, mais ces déterminations ne sont ni assez faciles ni assez sûres pour pouvoir établir avec certitude la petite différence qui existe dans la composition centésimale de ces deux combinaisons. Par contre, la méthode de M. Kjeldahl pour le dosage de l'azote, quand elle est appliquée comme il a été dit plus haut, donne des résultats très exacts et permet de déterminer avec précision la composition qui, pour les quatre combinaisons dont il s'agit ici, se trouve être $RCl, 6HgCl_2$.

---

[1]) Topsøe, l. c. p. 96—100.

1,0317 gr. sel, séchés dans le vide, ont, par cette méthode, donné 8,08 milligr. N. = 0,783 % N.

1,2150 gr. sel, séchés dans le vide, ont, par la même méthode, donné 9,70 milligr. N = 0,798 %.

0,310 gr. du sel, séchés dans le vide, ont été dissous dans l'eau et, après addition de $HNO_3$, on a précipité la solution par l'hydrogène sulfuré et recueilli le sulfure de mercure, au préalable lavé par décantation, sur un filtre d'asbeste de Soxklet séché à 110° et pesé, après quoi on l'a séché et pesé. Le liquide filtré a eté oxydé par $KMnO_4$ suivant le procédé de M. Topsøe[1]), et le chlore, déterminé comme à l'ordinaire. On a ainsi trouvé:

0,245 gr. HgS = 0,212 gr. Hg et 0,328 gr. AgCl = 0,081 gr. Cl

| | Calculé pour | | Trouvé |
|---|---|---|---|
| | $RCl . 5 HgCl_2$ | $RCl . 6 HgCl_2$ | |
| N | 0,95 % | 0,80 % | 0,783—0,798 % |
| Hg | 67,69 % | 68,64 % | 68,39 % |
| Cl | 26,36 % | 26,33 % | 26,13 % |

Le sel se dissout assez facilement dans l'eau chaude et l'alcool chaud; il est difficilement soluble dans l'eau froide et presque insoluble dans l'alcool froid.

Chloromercurate d'oxéthyltriméthylammonium, $RCl, 6 HgCl_2$ = 1762,43. On l'obtient en cristaux blancs hexagonaux bien développés (en formes rhomboédriques hémiédriques distinctes)[2]) en faisant cristalliser de nouveau le sel précipité.

Voici les résultats de l'analyse:

0,655 gr. du sel précipité, séchés dans le vide, ont donné 5 milligr. N par la méthode de M. Kjeldahl.

1,2575 gr. du sel de nouveau cristallisé, séchés dans le vide, ont donné 9,75 milligr. N par la même méthode.

0,435 gr. du sel précipité, séchés dans le vide, ont donné 0,342 gr. HgS = 0,2949 gr. Hg et 0,4580 gr. AgCl = 0,1132 gr. Cl.

0,6940 gr. du sel de nouveau cristallisé, séchés dans le vide, ont donné 0,5475 gr. HgS = 0,4719 gr. Hg et 0,7323 gr. AgCl = 0,1811 gr. Cl.

| | Calculé pour | | Trouvé |
|---|---|---|---|
| | $RCl . 5 HgCl_2$ | $RCl . 6 HgCl_2$ | |
| N | 0,94 % | 0,79 % | 0,764—0,775 % |
| Hg | 66,96 % | 68,08 % | 67,80—67,99 % |
| Cl | 26,08 % | 26,09 % | 26,02—26,10 % |

[1]) Oversigt over Vidsk. Selskabs Forhandlinger 1881 p. 28.

[2]) Topsøe l. c. 1882, p. 108.

M. Brieger[1]) a auparavant préparé cette combinaison et, d'après quelques déterminations du mercure, lui attribue la formule RCl, 6 $HgCl_2$; il soutient qu'on peut, à l'aide de cette combinaison, précipiter la choline quantitativement, quand la précipitation se fait dans une solution alcoolique, par une solution alcoolique de chlorure de mercure. C'est ce que mes recherches ont confirmé, et elles ont en outre montré que la choline peut aussi être précipitée quantitativement, si l'on emploie pour la précipitation un excès d'une solution de chlorure de mercure saturée à la température ordinaire (à 7 %), le sel double y étant insoluble. 10 cent. cub. d'une solution de chlorure de choline renfermant 0,358 gr. de chlorure ont été précipités par 10 cent. cub. d'une solution de chlorure de mercure. Deux expériences ont donné respectivement 4,4 et 4,3 gr. du sel double (calculé 4,5 gr.) et le liquide filtré, après avoir été débarrassé du mercure par l'hydrogène sulfuré et réduit par évaporation à un petit volume, n'a donné aucune réaction avec l'iodure de potassium iodé, qui — voir plus loin — est un réactif très sensible de la choline. Le sel double est donc insoluble dans une solution de chlorure de mercure, presque insoluble dans l'alcool froid, difficilement soluble dans l'eau froide, plus facilement soluble dans l'eau chaude.

Chloromercurate d'isopropyltriméthylammonium, RCl, 6 $HgCl_2$ = 1760,74. Comme les combinaisons précédentes, il cristallise en cristaux blancs hexagonaux, difficilement solubles dans l'eau froide mais plus facilement dans l'eau chaude, un peu solubles dans l'alcool chaud, mais insolubles dans l'alcool froid.

1,37 gr. sel, séchés dans le vide, ont donné 10,80 milligr. N.
0,710 gr. sel — — — 0,482 gr. Hg.

| | Calculé pour | | Trouvé |
|---|---|---|---|
| | RCl, 5 $HgCl_2$ | RCl, 6 $HgCl_2$ | |
| N | 0,94 % | 0,796 % | 0,788 % |
| Hg | 67,05 % | 68,09 % | 67,88 % |

Chloromercurate d'isooxypropyltriméthylammonium, RCl, 6 HgCl = 1776,40. Extérieurement, ce sel n'est pas à distinguer de la combinaison correspondante de choline, et cristallise comme elle en formes blanches hexagonales appartenant à l'hémiédrie rhomboédrique. Il se comporte aussi, sous le rapport de la solubilité, absolument comme la combinaison de la choline.

1,170 gr., séchés dans le vide, ont donné 8,55 milligr. N par la méthode de M. Kjeldahl.

---

[1]) l. c. II. p. 54—55.

0,4580 gr., séchés dans le vide, ont donné 0,36 gr. $HgS$ = 0,3105 gr. Hg, et le liquide filtré a été oxydé par le procédé de M. Topsøe, puis titré avec un solution de $AgNO_3$ au $^1/_{10}$, avec du rhodanure d'ammmonium comme indicateur; on a employé 32,58 cent. cub. $AgNO_3$ correspondant à 0,1186 gr. Cl.

| | Calculé pour | | Trouvé |
|---|---|---|---|
| | $RCl, 5HgCl_2$ | $RCl, 6HgCl_2$ | |
| N | 0,93 % | 0,79 % | 0,731 % |
| Hg | 66,34 % | 67,60 % | 67,80 % |
| Cl | 25,84 % | 25,89 % | 25,89 % |

### D. Iodures doubles de mercure.

Traités par une solution d'iodure de mercure dans l'iodure de potassium (réactif de Meyer), les sels des bases dont il s'agit ici donnent des précipités cristallins blanc jaunâtre ou jaunes qui, examinés au microscope, se montrent composés non pas d'une, mais au moins de deux combinaisons. Séparer ces combinaisons l'une de l'autre semble être une chose fort difficile, mais l'une d'elles s'obtient facilement à l'état de pureté par le procédé suivant. On dissout 10 grammes d'iodure de potassium dans 150 cent cub. d'eau bouillante et y ajoute, pendant que l'eau continue à bouillir et après l'avoir réduit en poudre fine, du chlorure double de mercure de la base considérée ($RCl, 6HgCl_2$) autant qu'il peut s'en dissoudre. Le sel doit être ajouté par petites portions et quand il ne s'en dissout plus, on filtre la solution sur un filtre chaud dans un verre chauffé et laisse refroidir lentement. L'iodure double de mercure cristallise alors en gros cristaux bien développés qui sont recueillis sur un filtre en pierre ponce, lavés avec une petite quantité d'alcool, où ces combinaison sont un peu solubles, et séchés dans un courant d'air sec. Les combinaisons ainsi obtenues, qui ont une composition différente, les sels d'éthyl- et d'isopropyltriméthylammonium ayant la composition $RJ, HgJ_2$, tandis que ceux des oxybases correspondantes ont la composition $RJ, 2HgJ_2$, sont décomposées par l'eau, qui dissout une partie des sels et laisse un résidu jaune rougeâtre, mais je n'ai pas eu l'occasion d'examiner de plus près les produits de la décomposition.

Jodomercurate d'éthyltriméthylammonium, $RJ, HgJ_2$ = 667,28. Il cristallise en longs cristaux tétragonaux très faiblement jaunâtres, presque incolores, ayant le brillant de la soie, qu'on peut faire cristalliser de nouveau dans l'alcool ou une solution d'iodure de potassium, mais qui sont décomposés par l'eau. Cette combinaison peut encore être préparée en faisant dissoudre dans l'alcool bouillant

le même nombre de molécules d'iodure d'ammonium et d'iodure de mercure; la dernière détermination d'azote indiquée ci-dessous a été faite sur un sel ainsi préparé.

0,5941 gr., séchés dans le vide, ont donné 0,5931 gr., qui, par la méthode de M. Kjeldahl, ont donné 11,95 milligr. N = 2,02 % N.

0,2682 gr. du sel séché ont été délayés dans l'eau et, après avoir ajouté à la solution 20 cent. cub. d'hydrate de potasse à 10 %, on y a fait passer de l'hydrogène sulfuré jusqu'à ce que tout fût dissous. La solution a ensuite été rendue acide avec de l'acide sulfurique et le précipité de sulfure de mercure, filtré, lavé et redissous à l'aide de l'acide chlorhydrique et du chlorate de potasse, après quoi on a précipité de nouveau le mercure à l'état de sulfure et recueilli ce dernier sur un filtre d'asbeste. On a trouvé:

0,0930 gr. Hg S = 0,0806 gr. Hg.

0,4703 gr., séchés dans le vide, ont, par la méthode de M. Kjeldahl, donné 9,70 milligr. N.

| | Calculé pour $RJ . HgJ_2$ | Trouvé |
|---|---|---|
| N | 2,09 % | 2,02—2,06 % |
| Hg | 29,94 % | 30,05 % |

Jodomercurate d'oxéthyltriméthylammonium, $RJ, 2HgJ_2$ = 1136,12. Par le procédé mentionné plus haut, ce sel cristallise en cristaux monocliniques, bien développés et fortement colorés en jaune qui, à l'état sec, fondent à 131° (trouvé 130,8, 131 et 131°,3), mais qui, si l'on essaie de le faire de nouveau cristalliser dans une solution d'iodure de potassium, y fondent en une masse, par conséquent à une température bien plus basse (trouvé 85 à 85°,5). Il n'est pas facilement soluble dans l'alcool, mais on peut cependant le soumettre à une nouvelle cristallisation dans ce liquide; l'eau le décompose.

0,730 gr., séchés dans le vide, ont, par la méthode de M. Kjeldahl (après avoir bouilli deux heures avec $H_2SO_4$) donné 8,10 milligr. N.

0,4780 gr., séchés dans le vide, ont, par cette méthode (après avoir bouilli 12 h. avec $H_2SO_4$), donné 5,8 milligr. N.

0,2405 gr., séchés dans le vide, ont donné 0,098 gr. Hg S = 0,0845 gr. Hg et[1]) 0,2457 gr. Ag J = 0,1327 gr. J.

| | Calculé pour Chol. $J, 2HgJ_2$ | Trouvé |
|---|---|---|
| N | 1,23 % | (1,11)—1,21 % |
| Hg | 35,17 % | 35,13 % |
| J | 55,69 % | 55,18 % |

[1]) D'après Topsøe, l. c.

Si l'on prépare le sel en laissant refroidir une solution de 1 mol. de chlorure de choline et de 2 mol. d'iodure de mercure dans l'alcool, il cristallise en longues aiguilles incolores (en apparence les mêmes que celles qui sont mélangées avec la combinaison jaune qu'on obtient en précipitant la choline par l'iodure de mercure dissous dans l'iodure de potassium), qui fondent à 75° (trouvé 74,5 et 75°) et semblent avoir la composition Chol. Cl, $Hg J_2$.

0,6365 gr., séchés dans le vide, ont donné 14,45 milligr. N.

0,2420 gr., séchés dans le vide, ont donné 0,0806 gr. Hg (0,0935 gr. Hg S).

0,3455 gr., séchés dans le vide, ont donné 0,1330 gr. Hg S = 0,1146 gr. Hg.

0,3642 gr. Ag Cl + Ag J = 105,4 %.

| | Calculé pour Chol. J, $Hg J_2$ | Calculé pour Chol. Cl, $Hg J_2$ | Trouvé |
|---|---|---|---|
| | 683,24 | 592,07 | |
| N | 2,05 | 2,36 | 2,27 % |
| Hg | 29,24 | 33,75 | 33,30—33,19 % |
| Ag J | 102,80 | — | — |
| Ag Cl + Ag J | — | 105,27 | 105,5 |

Jodomercurate d'isopropyltriméthylammonium, RJ, $HgJ_2$ = 681,25. On l'obtient par le procédé indiqué plus haut en aiguilles sans doute tétragonales, faiblement jaunâtres, solubles dans l'alcool et l'iodure de potassium.

0,5080 gr., séchés dans le vide, ont, par la méthode de M. Kjeldahl, donné 10,40 milligr. N.

| Calculé | Trouvé |
|---|---|
| 2,057 % N | 2,05 % |

Un essai pour préparer ce sel en mélangeant dans l'alcool des solutions chaudes d'un nombre égal de molécules d'iodure d'ammonium et d'iodure de mercure, a donné pour résultat un précipité blanc cristallin très difficilement soluble dans l'alcool, et formé de cristaux tétragonaux dont la teneur en azote correspond à la composition 2 R J, $Hg J_2$ = 909,62.

0,5125 gr., séchés dans le vide, ont donné 15,5 milligr. N.

| Calculé | Trouvé |
|---|---|
| 3,08 % N | 3,03 % |

Jodomercurate d'isooxypropyltriméthylammonium, R J, 2 $Hg J_2$ = 1150,09. Préparé par la méthode indiquée plus haut,

il a donné des cristaux monocliniques bien développés, d'un très beau jaune, dont la longeur atteint jusq'uà 1 centimètre. De même que chez la combinaison correspondante de la choline, la forme cristalline est complètement celle du feldspath. Fond à 102°.

0,4225 gr., séchés dans le vide, ont, par la métbode de M. Kjeldahl, donné 5,10 milligr. N.

| Calculé | Trouvé |
|---|---|
| 1,218 % N | 1,208 % |

### E. Polyiodures.

C'est un fait connu qu'un grand nombre de bases organiques azotées se combinent avec l'iode pour former des polyiodures, et nous trouvons aussi cette propriété chez les bases dont il s'agit ici. En ce qui concerne la base de l'éthyltriméthylammonium, M. Müller[1]) a obtenu les combinaisons $R\,J_3$ et $R\,J_5$, en faisant dissoudre dans l'alcool les quantités calculées d'iodure et d'iode, et indique pour leurs points de fusion respectivement 64 et 68°, tandis que M. Geuther[2]) trouve pour le point de fusion du pentaiodure 26°; M. Geuther a en outre obtenu la combinaison $R\,J_9$, l'ennéaiodure, qui forme des cristaux verts et fond à 38°.

Si l'on traite une solution de chlorure de choline par un grand excès d'une solution concentrée d'iode dans l'iodure de potassium, on obtient l'ennéaiodure d'oxéthyltriméthylammonium $R\,J.J_8 = 1242{,}68$, sous forme d'un précipité vert cristallin, à éclat métallique, qui fond à 49° (trouvé 48,5, 49 et 49°,5) et se dissout facilement dans l'alcool froid et chaud, tandis qu'il est difficilement soluble dans le chloroforme et l'éther; si l'on essaie de le dissoudre dans l'éther, il se liquéfie d'abord (probablement en formant le polyiodure mentionné plus bas), et cette combinaison fluide se dissout encore plus difficilement. Exposé à l'air, il perd de l'iode. Le sel fraîchement précipité est recueilli sur un filtre en asbeste, lavé avec de l'eau froide et séché entre des feuilles de papier à filtrer.

0,362 gr. ont été dissous dans l'alcool et la solution, étendue d'eau avec addition de quelques cristaux d'iodure de potassium, a été titrée avec de l'hyposulfite de soude. On a employé 32,7 cent. cub. d'hyposulfite correspondant à 0,2956 gr. d'iode, et évaporé ensuite

---

[1]) Liebigs Ann. 108, p. 1.
[2]) ibid. 240, p. 66.

la solution, qui, par la méthode de M. Kjeldahl, à donné 4,15 milligr. N.

0,371 gr. traités de la même manière ont demandé 33,4 cent. cub. d'hyposulfite, correspondant à 0,3091 gr. d'iode, et donné 3,90 milligr. N.

| | Calculé | Trouvé |
|---|---|---|
| N | 1,13 | 1,15—1,05 |
| J | 10,18 | — |
| $J_8$ | 81,46 | 81,66—81,38 |

Si l'on précipite la solution de chlorure de choline avec une quantité d'iode plus petite, il se forme un iodure inférieur brun noirâtre, bitumineux, qui, par une nouvelle addition d'iode, se transforme en ennéaiodure. Le polyiodure inférieur, qui est liquide à la température ordinaire, puisqu'il fond à 8 °, est très difficile à préparer pur, et les analyses que j'en ai faites ne s'accordent pas bien, mais la composition semble en être celle du pentaiodure $RJ \, . \, J_4$, car l'analyse a donné pour le rapport entre l'azote et l'iode libre 1 : 4,7, et le rapport entre l'iode combiné et l'iode libre est 1 : 4,6, de sorte que la combinaison renferme un excès d'iode.

Une solution d'iodure d'isopropyltriméthylammonium donne avec l'iode dissous dans l'iodure de potassium un précipité vert à éclat métallique, qui a la plus grande ressemblance avec l'ennéaiodure de la base d'éthyle, tandis que l'iodure d'isooxypropyltriméthylammonium donne une combinaison liquide foncée qui ne semble pas devenir solide par une addition d'iode. Un étude plus complète de ces combinaisons manque encore.

---

Une solution alcoolique de chlorure de choline donne un précipité avec une solution alcoolique de différents sels métalliques. C'est ainsi, par exemple, que, par le refroidissement d'un mélange de deux solutions de chlorure de choline et de chlorure de cadmium, on obtient un chlorure double de choline et de cadmium $RCl, Cd\,Cl_2$, cristallisé en aiguilles monocliniques blanches facilement solubles dans l'eau, difficilement solubles dans l'alcool et presque insolubles dans l'éther.

0,2355 gr. ont, par la méthode de M. Kjeldahl, donné 10,15 milligr. N.
0,2350 gr. ont, par évaporation avec $H_2SO_4$, donné 0,1510 gr. $CdSO_4$.
0,2280 gr. ont pris 21,15 cent. cub. $AgNO_3$ normal à $^1/_{10}$, correspondant à 0,075 gr. Cl.

| Calculé | | Trouvé |
|---|---|---|
| 4,35 % | N. | 4,31 % |
| 34,68 % | Cd. | 34,50 % |
| 33,03 % | Cl. | 32,89 % |

Avec le chlorure du zinc on a un précipité floconneux, soluble dans un excès du réactif et qui, après une nouvelle cristallisation dans l'alcool absolu, se dépose en petites aiguilles tétragonales incolores, très hygroscopiques et ayant la composition 2 RCl, Zn $Cl_2$.

0,209 gr. ont, par le méthode de M. Kjeldahl, donné 14,15 milligr. N.
0,4505 gr. ont été précipités par $Na_2 CO_3$ etc., et ont donné 0,0884 gr. Zn O = 0,0709 gr. Zn.
0,209 gr. ont pris 20,05 cent. cub. Ag $NO_3$ normal à $^1/_{10}$, correspondant à 0,0711 gr. Cl.

| Calculé | | Trouvé |
|---|---|---|
| 6,76 % | N | 6,77 % |
| 15,69 % | Zn | 15,54 % |
| 34,12 % | Cl | 34,03 % |

Le bromure de choline, préparé en traitant une solution du chlorure par de l'oxyde d'argent précipité, et en neutralisant la base par une solution aqueuse étendue d'acide bromhydrique, cristallise en petites aiguilles hygroscopiques très facilement solubles dans l'eau et l'alcool chaud, plus difficilement solubles dans l'alcool froid et insolubles dans l'éther.

0,270 gr., séchés dans le vide sur $H_2 SO_4$, ont donné 20,50 milligr. N.

| Calculé | | Trouvé |
|---|---|---|
| 7,63 % | N. | 7,59 % |

En ajoutant une solution concentrée d'acide bromoplatinique à une solution également concentrée de bromure de choline, on obtient un très beau précipité cristallin rouge ponceau qui, par le refroidissement lent d'une solution aqueuse, cristallise en longues aiguilles tétragonales insolubles dans l'alcool et l'éther.

Le bromure double de choline et de platine a la composition $R_2 Pt Br_6$ = 880,50.

0,379 gr., séchés dans le vide, ont donné 0,835 gr. Pt.

| Calculé | | Trouvé |
|---|---|---|
| 22,07 % | Pt. | 22,05 % |

Le bromure de choline donne avec une solution d'acide bromaurique un précipité rouge cristallin de bromure double de choline et

d'or $RAuBr_4$ = 619,06, qui, par une nouvelle cristallisation dans l'eau, se dépose en cristaux rouges hexagonaux solubles dans l'eau — la solution portée à l'ébullition laisse dégager des vapeurs de brome — et dans l'alcool, mais insolubles dans l'éther.

0,428 gr., séchés dans le vide, ont donné 0,1355 gr. Au.
0,521 gr., séchés dans le vide, ont, par la méthode de M. Kjeldahl, donné 11,90 milligr. N.

| Calculé | | Trouvé |
|---|---|---|
| 31,69 % | Au. | 31,66 % |
| 2,26 % | N. | 2,28 % |

# Quelques remarques sur l'emploi de l'oxyde de mercure dans l'analyse élémentaire des substances organiques.

Par

J. Kjeldahl.

La méthode d'analyse élémentaire publiée déjà en 1876 par Mitscherlich[1]), et par laquelle l'oxygène est déterminé directement à l'aide de Hg O, n'a pas réussi à se répandre malgré les principes incontestablement exacts sur lesquels elle repose. L'oxydation, qui a lieu ici exclusivement aux dépens de Hg O, se fait dans un tube rempli d'azote, où la substance à analyser et Hg O sont intimement mélangés. La combustion une fois terminée, on distille le mercure réduit à une température qui n'est pas assez élevée pour décomposer l'oxyde et on le pèse.

Bien que ces opérations un peu délicates — outre d'autres circonstances qui seront mentionnées plus loin — aient pu faire obstacle à la propagation de la méthode, il est cependant étrange qu'on n'ait pas employé plus souvent Hg O dans l'analyse élémentaire, telle qu'elle se pratique suivant le schéma ordinaire — combustion dans un courant d'air ou d'oxygène — étant donnée la précieuse qualité dont jouit cet oxyde de brûler toutes les substances organiques à une température de 3—400°.

Comme j'ai souvent et de plusieurs manières employé Hg O dans l'analyse élémentaire, je communiquerai ici quelques-uns des résultats de mon expérience. Qu'ils ne renferment rien de bien nouveau — Lavoisier déjà s'est servi de Hg O pour l'analyse élémentaire — je ne saurais trop le relever.

---

[1]) Zeitschr. f. anal. Ch. 15, p. 371.

On prépare l'oxyde de mercure granulé, comme l'a fait M. Mitscherlich, en humectant d'abord l'oxyde pulvérisé avec de l'acide azotique fumant; on le chauffe ensuite au bain de sable jusqu'à ce que l'humidité ait disparu et, après avoir divisé la masse, qui est assez dure, en morcaux d'une grosseur convenable, on en chasse complètement les oxydes d'azote en les chauffant à 400° environ dans un tube de verre que traverse lentement un courant d'air. Le chauffage peut se faire dans le tube à combustion ou dans un tube en U, dans le bain d'air dont il sera parlé plus loin. Pendant cette opération, il se forme un nitrate mercureux basique jaune qui souvent se dépose en belles et longues aiguilles cristallines, et il faut veiller avec soin à ce que Hg O ne soit pas mélangé de ce sel. L'oxyde de mercure est réduit en particules depuis la grosseur d'un pois jusqu'à celle d'une graine de pavot. La poudre, qui traverse un crible dont les trous ont 1 millim. environ, est soumise de nouveau au traitement qui précède; elle constitue toujours une grande partie de la masse, l'oxyde granulé n'ayant qu'une faible cohésion. Ce défaut et la préparation relativement difficile de l'oxyde de mercure le placent dans des conditions défavorables vis-à-vis de l'oxyde de cuivre, mais il a sur ce dernier l'avantage d'avoir une action rapide, de n'être pas hygroscopique et de pouvoir être employé à une température peu élevée.

Une des principales objections contre l'emploi de Hg O comme oxydant, c'est sa volatilité bien sensible à 100°. En présence de la vapeur d'eau cette volatilité est même si grande que, si on ne prend pas des mesures spéciales, une quantité considérable de mercure passe dans le tube à chlorure de calcium, de sorte que les déterminations de l'hydrogène deviennent beaucoup trop fortes. On remédie en grande partie à cet inconvénient en plaçant dans la partie antérieure du tube à combustion une colonne de copeaux d'étain de 10—15$^{cm}$; mais le moyen le plus efficace et le plus commode, c'est de faire passer l'eau dans le tube à chlorure de calcium à la température ordinaire (ou un peu plus élevée) en faisant le vide dans l'appareil, la tension de la vapeur de mercure diminuant beaucoup plus avec la température que celle de la vapeur d'eau, de sorte que le rapport entre ces tensions à 20°, par exemple, est comme 1 : 13600, tandis qu'à 100° il est comme 1 : 2600. Aussi le mercure n'est-il, à de basses températures, que peu volatil dans le vide en présence de la vapeur d'eau.

Relativement à la disposition de l'appareil, il n'y a pas grand chose à ajouter à la pratique bien connue de ce genre d'analyse, de même que le fourneau ordinaire peut être employé sans changement. Deux gazomètres, dont l'un renferme de l'air atmosphérique et l'autre de l'oxygène, communiquent chacun à part avec les appareils destinés

à dépouiller l'air de sòn humidité et de son acide carbonique. Avant d'entrer dans le tube à combustion, le courant doit encore passer une petite éprouvette contenant quelques gouttes de mercure et un robinet en verre. Je ne saurais trop relever la nécessité de cette éprouvette, qui est recommandée entre autres par M. Löwe[1]); le faible courant d'air qu'on maintient à travers le tube à l'aide du gazomètre et de l'aspirateur placés respectivement derrière et devant l'appareil, ne peut pas empêcher les produits de la combustion de se mouvoir en sens contraire quand le dégagement du gaz est très actif. J'ai, dans ce cas, souvent vu le mercure monter dans le tube de l'éprouvette, et obtenu cependant de bons réultats; mais en l'absence de cet appendice, une partie de l'acide carbonique et de la vapeur d'eau aurait passé dans les appareils de dessication et de lavage.

Le tube à combustion est assez long, 90—100$^{cm}$, et étiré en pointe sur le devant. La partie antérieure, sur une longueur de 10—20$^{cm}$, sort du fourneau et ne renferme qu'une spirale en fil de fer, qui maintient en place un bouchon d'asbeste, et est suivie d'une couche d'abord longue de 50$^{cm}$ de $HgO$ granulé. La partie postérieure vide du tube reçoit la nacelle de porcelaine avec la substance à analyser. La partie antérieure du tube est entourée d'un simple bain d'air en ferblanc qui est chauffé à 30$^{0}$ environ par une très petite flamme. La pointe du tube est reliée comme d'ordinaire aux appareils d'absorption pour l'eau et l'acide carbonique et à l'aspirateur, de même qu'on peut facilement par un robinet à trois voies établir une communication avec la pompe.

Quand le tube, après avoir reposé quelque temps, doit être mis en activité, on allume les becs de gaz au-dessous de $HgO$, en leur donnant seulement une petite flamme pour ne chauffer le tube qu'à 400$^{0}$ environ (l'oxyde de mercure devient alors brun noirâtre), ferme ensuite le robinet en verre derrière le tube à combustion et met ce dernier en communication avec la pompe à air, qui y fait le vide (30$^{mm}$) en quelques minutes, après quoi on ferme cette communication et fait entrer lentement l'air par le robinet en verre. Sans la spirale en fer mentionnée plus haut, le bouchon d'asbeste et l'oxyde de mercure seraient facilement déplacés qnand on fait le vide.

On relie alors le tube aux appareils d'absorption préalablement pesés de même que ceux-ci à l'aspirateur, et introduit la substance à analyser, également pesée, dans la nacelle de porcelaine (le platine est assez fortement attaqué par le mercure), après quoi et sans tarder, on enfonce à frottement derrière la nacelle un bouchon d'asbeste fraîchement rougi, qui, notamment avec les substances volatiles, contribue

---

[1]) Zeitschr. f. anal. Ch. 11, p. 407.

beaucoup à empêcher une sublimation rétrograde. Les substances non volatiles sont brûlées dans l'oxygène et les substances volatiles dans l'air atmosphérique, sauf pendant quelques minutes dans l'oxygène, à la fin de l'opération. La combustion peut se faire en très peu de temps, 1/4 à 3/4 d'heure. L'oxyde de mercure abandonne son oxygène avec une si grande rapidité que, dans une combustion de thymol qui se fit en quelques secondes, presque à la façon d'une explosion, je trouvai cependant plus de 98 % de la quantité calculée de carbone; dans ce cas, il y avait, outre l'appareil ordinaire à boules, deux tubes en U avec de la chaux sodique pour l'absorption de l'acide carbonique.

Avant de commencer une nouvelle analyse, on dresse le tube verticalement, ce qui permet à la colonne d'oxyde du mercure de se tasser de nouveau et au mercure réduit d'être recueilli à la pointe antérieure du tube. Quand la longueur de la colonne de Hg O est réduite à 35 cm, on la ramène à 50 cm en y ajoutant de l'oxyde frais.

On trouvera ci-dessous les résultats de quelques analyses avec Hg O. Celles de la série I ont été faites avec une colonne de copeaux d'étain dans la partie antérieure du tube, tandis que pour celles de la série II, on a fait le vide dans le tube.

I.

| | | $CO_2$ | | $H_2O$ | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Trouvé | Calculé | Trouvé | Calculé |
| Sucre de canne | 0,4364 gr. | 0,6705 gr. | 0,6737 gr. | 0,2508 gr. | 0,2521 gr. |
| do. | 0,3960 „ | 0,6047 „ | 0,6015 „ | 0,2388 „ | 0,2288 „ |
| Glucose | 0,3334 „ | 0,4870 „ | 0,4890 „ | 0,2043 „ | 0,2000 „ |
| Mannite | 0,4469 „ | 0,6457 „ | 0,6482 „ | 0,3127 „ | 0,3092 „ |
| Acide benzoïque | 0,4225 „ | 1,0717 „ | 1,0743 „ | 0,1921 „ | 0,1870 „ |
| Acide salicylique | 0,4165 „ | 0,9280 „ | 0,9296 „ | 0,1689 „ | 0,1657 „ |
| Thymol | 0,2543 „ | 0,7472 „ | 0,7459 „ | 0,2185 „ | 0,2136 „ |

II.

| | | $CO_2$ | | $H_2O$ | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Trouvé | Calculé | Trouvé | Calculé |
| Sucre de canne | 0,3560 gr. | 0,5475 gr. | 0,5497 gr. | 0,2050 gr. | 0,2057 gr. |
| do. | 0,3594 „ | 0,5545 „ | 0,5550 „ | 0,2045 „ | 0,2076 „ |
| Acide salicylique | 0,2730 „ | 0,6080 „ | 0,6093 „ | 0,1050 „ | 0,1069 „ |
| Acide benzoïque | 0,3112 „ | 0,7883 „ | 0,7857 „ | 0,1398 „ | 0,1378 „ |
| Mannite | 0,4049 „ | 0,5903 „ | 0,5939 „ | 0,2820 „ | 0,2832 „ |

L'oxyde de mercure convient moins bien pour l'analyse des substances azotées quand on emploie Cu ou Ag pour détruire les oxydes d'azote, puisque, en pareil cas, il faut recourir à une haute température. Parmi les moyens recommandés pour l'absorption des oxydes d'azote à des températures plus basses, j'ai trouvé que le bioxyde de plomb ne donne pas d'aussi bons résultats que le mélange de peroxyde de manganèse et de chromate de potasse proposé par M. Perkins. Voici quelques exemples d'analyses faites par ce procédé.

| | | $CO_2$ | | $H_2O$ | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Trouvé | Calculé | Trouvé | Calculé |
| Asparagine | 0,2598 gr. ... | 0,351 gr. | 0,346 gr. | 0,147 gr. | 0,142 gr. |
| Caféine | 0,3105 „ ... | 0,571 „ | 0,563 „ | 0,152 „ | 0,144 „ |
| Strychnine | 0,2120 „ ... | 0,605 „ | 0,600 „ | 0,129 „ | 0,125 „ |

---

La méthode connue de M. Brunner[1]) pour déterminer le carbone dans les substances organiques en les oxydant avec l'acide sulfurique et le bichromate de potasse (ou l'acide chromique), a longtemps été employée avec la modification de M. Ullgren[2]) pour la détermination du carbone dans le fer, de même qu'on s'en est servi, d'après la recommandation de M. Wolff[3]), pour déterminer l'humus de la terre végétale; mais, en ce qui concerne ce dernier emploi, MM. Warrington et Peake[4]) ont prouvé qu'on obtient seulement les $^4/_5$ de l'acide carbonique produit par la combustion avec Cu O. Dans ces derniers temps, cette méthode a été reprise pour la détermination du carbone dans toutes sortes de substances organiques, notamment par MM. Cross et Bevan[5]) et par M. Messinger[6]); mais ces auteurs sont arrivés à des résultats différents, les deux premiers ayant trouvé qu'une partie du carbone n'est transformée qu'en oxyde de carbone et, par suite, qu'on ne peut obtenir des résultats exacts qu'en mesurant les gaz développés au lieu de les peser, tandis que M. Messinger, dans l'analyse d'un grand nombre de substances de diverse nature, obtient tout le carbone à l'état d'acide carbonique et, en général, des valeurs qui s'accordent bien avec le calcul.

---

[1]) Jahresber. v. Liebig u. Kopp 1875, p. 773.
[2]) Zeitschr. f. anal. Ch. 2, p. 430.
[3]) Anleitung zur chem. Untersuchung landwirthsch. wichtiger Stoffe.
[4]) Journ. of the chem. Soc. Sptbr. 1880.
[5]) Chem. News, 50, p. 217. — Journ. of the chem. Soc. 53, p. 889.
[6]) Ber. d. d. chem. Ges. 21, p. 2910.

Les analyses que j'ai faites par cette méthode m'ont conduit à peu près au même résultat que MM. Cross et Bevan, car, sauf dans quelques cas, il y avait toujours un déficit de $CO_2$, bien que j'opérasse exactement comme l'indique M. Messinger. Une correspondance que nous avons eue à ce sujet n'a pas éclairci la question.

La propriété qu'a l'oxyde de mercure, à une basse température, de pousser jusqu'au bout, avec une grande énergie, une oxydation incomplète, m'a donné l'idée de suppléer au défaut de la méthode en intercalant, entre le ballon où se fait la réaction et l'appareil à boules, un tube renfermant de l'oxyde de mercure chauffé à 400° environ, et aussitôt après ce changement, la méthode a donné de bons et constants résultats. Ces recherches étaient terminées quand a paru un nouveau travail de M. Messinger[1]), dans lequel il raconte qu'après avoir lui aussi, dans quelques cas, trouvé trop peu d'acide carbonique, il a suppléé à la méthode en intercalant un tube rempli d'oxyde de cuivre et chauffé au rouge. Bien que la présente communication sur une modification analogue vienne ainsi après coup, je n'ai cependant pas voulu la retenir, $HgO$ devant certainement ici être préféré à $CuO$, que j'ai également essayé sans que le résultat ait toujours été satisfaisant.

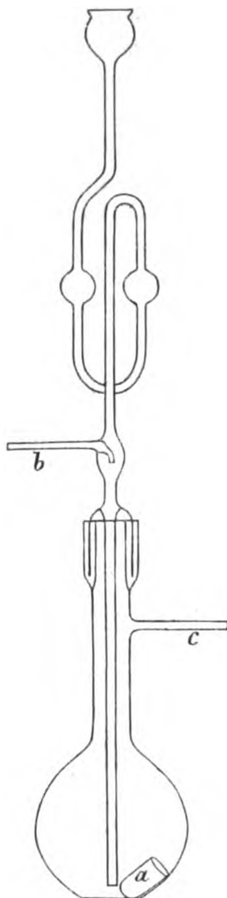


Fig. 1.

Les figures 1 et 2 montrent l'appareil et sa disposition. L'oxydation se fait dans le ballon représenté Fig. 1, qui est à peu près le même que celui qu'ont employé MM. Classen et Messinger. Le tube *b* y fait pénétrer un courant d'air qui en sort par le tube *c* avec les produits de l'oxydation; *b* fait corps avec le tube de sûreté, par lequel est introduit l'acide sulfurique, et *c* avec lecol du ballon. Le tube de sûreté est réuni au ballon par une fermeture au mercure, qui est complètement hermétique, et n'est pas, comme un bouchon en caoutchouc, attaquée par les éclaboussures du mélange acide. On introduit dans le ballon 10 gr. de bichromate de potasse et une petite ampoule en verre avec la substance à analyser, après quoi le tube de sûreté

[1] Ber. d. d. chem. Ges. 23, p. 2756.

est mis en place et la fermeture établie avec du mercure; on verse ensuite dans ce tube de l'acide sulfurique en quantité suffisante pour isoler le ballon, et ferme le tube *c* avec un petit bouchon d'asbeste.

La Fig. 2 montre la disposition de tout l'appareil. Du gazomètre à gauche, un courant d'air lent est conduit à travers le flacon laveur *A,* qui contient une solution de soude, et l'éprouvette *B,* dans le ballon *C.* Ce dernier est relié à un tube en U, long de 16$^{cm}$, renfermant l'oxyde de mercure et qui, dans le bain d'air *D* revêtu de carton d'asbeste, est chauffé à 3—500$^{0}$ à l'aide d'une seule lampe Bunsen, sans aucun régulateur. Comme l'oxyde de mercure ne sert ici qu'à compléter l'oxydation, il n'a presque jamais besoin d'être renouvelé, et on est par suite dispensé de l'ennui d'avoir à le régénérer.

Le tube en U est suivi du flacon laveur *E,* qui contient de l'acide sulfurique concentré, et de l'appareil à boules *F.* Le régulateur *H* sert à maintenir une faible dépression dans l'appareil, et peut surtout être utile quand le dégagement de $CO_2$ est très rapide. Il se compose d'un cylindre en verre long et étroit, fermé par un bouchon de caoutchouc qui donne passage à trois tubes, dont les deux latéraux se rendent respectivement à l'appareil à boules et à la pompe à air, tandis que celui du milieu peut facilement être relevé et abaissé, et plonge dans le liquide (acide sulfurique ou mercure, ou mercure recouvert d'acide sulfurique) qui remplit à moitié le cylindre. En faisant jouer la pompe et varier la positition de ce tube, on peut facilement obtenir dans l'appareil la pression voulue. *G* est un tube à chlorure de calcium dont on peut se passer quand *H* renferme de l'acide sulfurique.

Lorsque l'appareil, à l'exception de *F,* est monté, on y fait passer un courant d'air pour en chasser l'acide carbonique qui pourrait s'y trouver, après quoi on y adapte l'appareil à boules et verse de l'acide sulfurique (30 cent. cub.) dans le ballon par le tube de sûreté. La lampe au-dessous de *D* doit alors avoir été allumée pendant 5 minutes. L'opération est du reste conduite comme l'indique M. Messinger; on chauffe faiblement jusq'uà ce que $CO_2$ commence à se dégager, et retire ensuite la lampe, sauf à la remettre sous *D* si le dégagement se ralentit. Les diverses substances peuvent, à cet égard, se comporter différemment, les unes demandant un chauffage assez long avant que le dégagement commence, tandis qu'avec d'autres il se produit dès qu'on a ajouté l'acide sulfurique. La flamme doit toujours être très petite, de manière que le sulfate de bioxyde de chrome insoluble ne commence à se former qu'au bout d'une heure et demie. L'opération est alors terminée; en continuant à chauffer, ce précipité incommode se produit en grande quantité. On ne l'évite cependant pas tout à fait, mais il

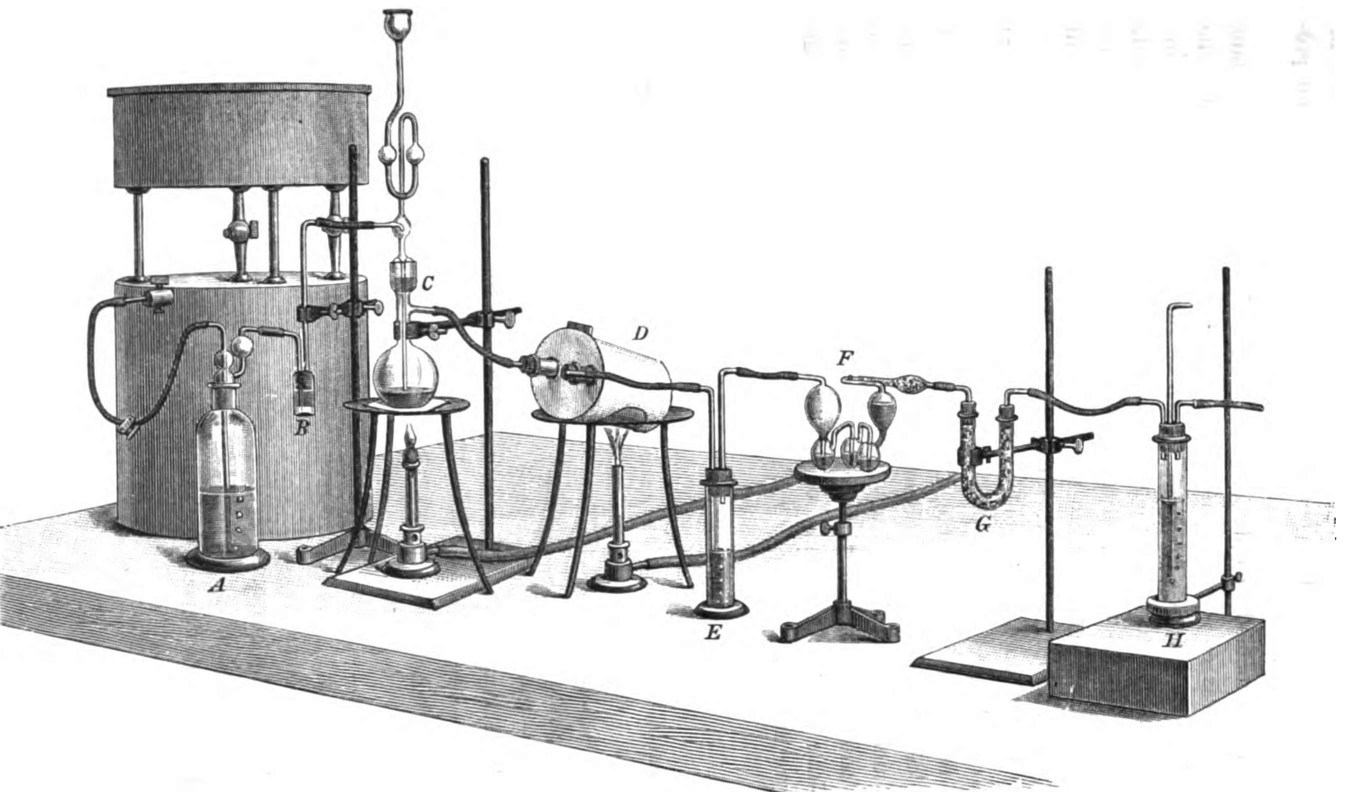



Fig. 2.

se désagrège facilement après avoir été chauffé avec une solution de soude concentrée. En employant l'acide chromique, j'ai eu un précipité tout semblable (cfr. Ullgren l. c.).

Cette méthode mérite à un haut degré d'être recommandée dans tous les cas où il s'agit seulement de déterminer le carbone, car elle ne demande que peu d'exercice et peu de surveillance, et est en même temps peu coûteuse à cause du faible chauffage qu'on y emploie et de l'usure insignifiante de l'appareil. Les substances non azotées sont analysées de la même manière que les substances azotées, et on obtient toujours une exactitude très satisfaisante.

Le tableau suivant montre, pour quelques substances, la différence entre les analyses faites avec et sans HgO. Les nombres indiquent en milligrammes la quantité d'acide carbonique trouvée et celle qui a été déduite des formules. Pour l'acide acétique, l'alcool et l'éther, on a muni le ballon *C* d'une tube réfrigérant, ce qui n'a pas été fait pour les autres analyses (cfr. Ullgren et Messinger l. c.). Pour le chlorhydrate de phénylhydrazine, on a intercalé un tube avec du sulfate de cuivre anhydre.

| | Sans HgO | | Avec HgO | |
|---|---|---|---|---|
| | Trouvé | Calculé | Trouvé | Calculé |
| Sucre de canne | 410 | 411 | 405 | 402 |
| do. | 309 | 338 | 360 | 359 |
| do. | 380 | 396 | 434 | 436,5 |
| Glycérine | 375 | 405 | 477 | 482 |
| Acide citrique | 301 | 335 | 433 | 435 |
| Acide benzoïque | 412 | 419 | 556 | 553 |
| Acide salicylique | 402 | 445 | 522 | 522 |
| Acide hippurique | 370 | 377 | 491 | 494 |
| Urée | 184 | 183 | 258 | 259 |
| Caféine | 295 | 293 | 311 | 312 |
| Aniline | 448 | 461 | 501 | 503 |
| Acide acétique | — | — | 386 | 391 |
| Alcool éthylique | — | — | 608 | 610 |
| Ether éthylique | — | — | 541 | 545 |
| Chlorhydrate de phénylhydrazine | — | — | 360 | 358 |

# Analyses biologiques et zymotechniques de l'eau destinée aux brasseries.

Par

**Just Chr. Holm.**

## I. Procédé.

Au commencement de l'année 1888, M. le Professeur, Dr. E. Chr. Hansen émit, dans la Zeitschrift für das gesammte Brauwesen, ses idées sur le procédé à suivre dans l'analyse de l'eau des brasseries, et il indiqua en même temps une méthode zymotechnique. Il montra que la méthode hygiénique indiquée par M. Koch et généralement suivie auparavant, ne saurait s'appliquer au cas d'une analyse entreprise dans le but susdit, car en considérant la chose au point de vue zymotechnique, on doit arriver immédiatement à ce résultat que les questions soulevées ici sont tout autres que celles qui sont suscitées par l'examen de l'eau potable aux points de vue bactériologique et hygiénique et que, par conséquent, la méthode à suivre doit être différente. Du reste, le lecteur voudra bien se reporter au nouveau mémoire que M. Hansen a publié sur ce sujet dans la présente revue 1892, p. 123.

C'est également cette méthode que j'ai employée, en tout ce qu'elle a d'essentiel, dans la série assez considérable des diverses analyses, faites par moi, de l'eau provenant des réservoirs et conduits, soit du laboratoire de Carlsberg, soit des brasseries du Vieux Carlsberg.

Mes essais forment des séries comprenant les intervalles de janvier 1888 à octobre 1889 et de février à juin 1891, les échantillons étant puisés en partie aux conduites d'eau du laboratoire, en partie à celles des brasseries du Vieux Carlsberg, tant la principale que l'annexe.

Avant de prendre les échantillons, je lavai soigneusement l'extérieur des tuyaux de conduite, ainsi que de leurs robinets et boyaux. Il va

de soi que l'expérimentateur avait les mains très propres, que ses vêtements étaient bien nettoyés et que l'air ambiant était parfaitement calme. Avant de prendre les échantillons, je laissai couler l'eau pendant assez longtemps (une heure environ) en sorte qu'au moment de la prise, le conduit était purgé. Cette prise se fit dans des matras Chamberland stérilisés. Pourtant, si l'on veut transporter l'eau, il faut employer des flacons stérilisés à bouchon émerillé. Dans son „Manuel pratique d'analyse bactériologique des eaux", pp. 25—28, Paris 1891, M. Miquel a décrit et figuré des étuis fabriqués spécialement pour le transport de pareils échantillons d'eau, ainsi que les récipients qui s'y adaptent.

Après avoir fortement secoué le matras qui contient l'eau, on en prend des échantillons à l'aide de pipettes stérilisées dont le haut est muni d'un tampon d'ouate stérilisée.

Comme liquides nourriciers on a employé le moût de bière stérilisé et la bière basse de garde stérilisée, les récipients étant les flacons Freudenreich contenant 15 cmc du liquide. Leur stérilisation s'effectua dans une autoclave, à environ 125° C. et dura un quart d'heure. Cette stérilisation fait perdre à la bière une partie de sa teneur en alcool. Ainsi, enexpérimentant à cette occasion, j'ai constaté qu'une bière contenant de 5 à 6 % d'alcool en volume avant la stérilisation, n'en contenait que 2,8 % en volume après l'opération. La propriété désinfectante de la bière a donc subi un affaiblissement, bien que le liquide fît encore preuve d'une forte résistance à l'action des divers germes contenus dans l'eau; elle résistait surtout aux bactéries et mieux que le moût houblonné. Nous pouvons en conclure combien la bière dans son état naturel est avantageusement protégée contre les attaques des bactéries. Sans doute, le plus favorable serait de pouvoir employer la bière à ces expériences sans l'avoir préalablement stérilisée. C'est aussi ce que j'ai tenté à l'occasion, et j'ai également expérimenté avec de la bière faiblement chauffée. Ces procédés n'étant pas applicables à la bière, il ne resta plus autre chose à faire que d'utiliser la stérilisation par la chaleur, à moins d'employer le filtre Chamberland; cependant, cette filtration fait disparaître une quantité de l'acide carbonique et de l'alcool, et de plus altère la composition chimique du liquide.

En expérimentant j'ai introduit dans chaque flacon à moût $^1/_8$ cmc de l'échantillon d'eau, et dans chaque flacon à bière $^1/_2$ cmc de ce même échantillon. Toutefois on constata que l'eau pouvait être mauvaise au point de nécessiter qu'on l'étendît avant d'entreprendre l'ensemencement des liquides; en effet, il arriva parfois qu'après avoir été ensemencés de l'eau des conduits, les uns à $^1/_8$ cmc, les autres à $^1/_2$ cmc, tous les flacons furent infectés d'organismes. On transporta donc une cer-

taine portion de la quantité d'eau d'abord dans de l'eau stérilisée en proportions telles que $^1/_8$ cmc du mélange contînt $^1/_{32}$ cmc de la quantité d'eau prise pour l'analyse, soit 3 parties d'eau stérilisée pour 1 partie d'eau de conduits, et ce fut alors avec ce mélange qu'on entreprit l'ensemencement, tandis que simultanément on ensemençait avec l'eau de conduits non modifiée. Pour chaque analyse, on infecta 15 flacons à moût et 10 flacons à bière. Après avoir secoué les flacons on les exposa à une température de 25° C. environ, jusqu'au moment de les examiner.

Relativement aux séries d'expériences dont il est ici parlé et des liquides employés, j'observai que, déjà au bout de 2 ou 4 jours, les cultures à 25° C. produisaient des végétations de bactéries, quoique pour quelques-unes d'entre elles cette apparition n'eût lieu qu'après la 7e journée. Les flacons à bière, où, comme on l'a dit plus haut, ces végétations apparaissent rarement et en petit nombre, ne donnèrent signe d'infection qu'au bout de 7 ou 11 jours, rarement avant la fin du 5e. Alors les liquides louchissaient, se décoloraient, et parfois il s'y formait une membrane. Les moisissures ne surgissaient que plus tard, et surtout ne se développaient que très lentement et se trouvaient souvent très clairsemées dans les flacons à bière après la 7e journée. Il n'était pas toujours facile de découvrir les cellules ressemblant à des Saccharomyces; les phénomènes de la fermentation ne se produisaient point, et leurs évolutions étaient souvent faibles. Dans mes très nombreuses expériences, je n'ai jamais constaté d'évolution dans les flacons après la 14e journée.

En pratique il serait très important de pouvoir clore les analyses en moins de 14 jours. En conséquence, j'ai fait des expériences pour rechercher si la fin du 7e jour amenait ou laissait attendre l'évolution d'organismes dans les liquides employés, moût et bière. Je vis alors qu'il n'était pas tout à fait indifférent, quoique, peut-être, on puisse bien dire que le résultat principal est obtenu au bout de 7 jours.

Autre question! Peut-on limiter l'analyse à l'emploi du moût seul? Mes expériences prouvent qu'en pratique on peut généralement le faire, bien que des cas particuliers puissent donner lieu à une petite erreur.

Çà et là, durant les expériences, on a constaté ceci : bien que les flacons d'une série n'eussent pas tous fourni des végétations et que la dissémination eût été faite aussi complètement que possible, il y avait cependant plusieurs cas où les flacons infectés ne contenaient pas de cultures pures. En effet, on trouva dans un seul et même flacon deux microorganismes différents, p. ex., des bactéries et des cellules ressemblant à des Saccharomyces, ou bien des bactéries et des moisissures. On ne peut donc pas tirer les mêmes conclusions que MM. Lister,

Nägeli, Fitz et autres; car ils prétendent que si, après avoir fortement secoué le liquide infectant, l'on ensemençait à l'aide de gouttes un certain nombre de flacons, et que l'on constatât alors qu'ils n'étaient pas tous infectés, les organismes suspendus dans le liquide infectant seraient alors répartis de telle sorte qu'un seul germe au plus aurait passé par ensemencement dans chaque flacon infecté. Ces observations jouent un rôle important dans les méthodes de culture pure; c'est pourquoi je me suis exprimé explicitement sur ce sujet dans mon mémoire „Sur les méthodes de culture pure et, spécialement, sur la culture sur plaques de M. Koch et la limite des erreurs de cette méthode" (Comptes rendus des travaux du laboratoire de Carlsberg, vol. III, 1re livrais. p. 1, 1891.)

L'examen au microscope est naturellement nécessaire quand on veut savoir exactement quels sont ceux des divers organismes présents dans l'eau, qui peuvent se développer dans le moût et dans la bière.

La méthode de la gélatine appliquée à l'analyse pour brasseries, donne des résultats erronés. En ce qui concerne spécialement la gélatine mélangée de moût de bière, elle est un peu plus apte que le moût à fournir à certaines espèces de bactéries leur milieu nourricier, et plusieurs des bactéries qui existent dans l'eau sans pouvoir arriver à se développer dans le moût, pourront se développer dans cette gélatine; l'évolution des bactéries est encore mieux favorisée par l'emploi d'une préparation neutre de la gélatine mélangée d'extrait de viande et de peptone. L'inverse a lieu dans beaucoup de cas pour les levures qui, trouvant dans la gélatine un milieu nourricier de qualité inférieure, ne s'y développent pas, ou ne le font que difficilement, tandis que le moût, les alimentant mieux, en favorise l'évolution. C'est ainsi qu'on a constaté ce fait dans les nouvelles recherches de M. Hansen sur le Sacch. apiculatus et sa circulation dans la nature (Nouvelles recherches sur la circulation du Sacch. apiculatus dans la nature. Ann. des sciences naturelles. Botanique. Sér. VII, t. XI, n° 3, p. 185. 1890); car des cellules desséchées et affaiblies, appartenant à cette espèce et provenant d'échantillons de terre, se sont très promptement ravivées dans le moût, tandis qu'il n'en fut rien dans la gélatine mélangée de moût. J'ai moi-même fait des expériences sur divers Saccharomycètes, à l'état affaibli, tant des espèces qui produisent des maladies dans la bière que des espèces de culture, et je suis arrivé à des résultats analogues à ceux précédemment trouvés par M. Hansen. C'est donc pour cette raison qu'à propos des levures, l'on obtient des résultats erronés en appliquant le procédé de la gélatine à l'analyse zymotechnique de l'eau des brasseries.

Si l'on veut un exemple frappant de la fautivité complète des résultats obtenus par l'application de la méthode de la gélatine aux analyses zymotechniques de l'eau, on le trouvera dans la comparaison des résultats obtenus pour l'analyse de l'eau des brasseries, par la méthode hygiénique de M. Koch et la méthode zymotechnique de M. Hansen, parallèle que M. Fr. Schwackhöfer donne dans son mémoire „Beitrag zur Beurtheilung des Wassers für die Zwecke der Brauerei und Mälzerei“ (Mittheil. der oesterr. Versuchsstation für Brauerei und Mälzerei in Wien. Heft III. 1890).

Un autre résultat erroné, comme le prouve ce qui précède, provient de la fusion des deux méthodes telle que certains zymotechniciens ont pensé devoir la faire et consistant à ensemencer d'abord avec l'eau d'essai la gélatine mélangée de moût, puis à ensemencer avec les colonies qui s'y sont dévéloppées, le moût et la bière, afin d'examiner plus tard lesquels des organismes développés dans la gélatine sont capables d'évolution dans les liquides en question.

Dans le liquide d'un flacon, deux germes de nature analogue ou différente trouvent abondamment les chances favorables pour se développer côte à côte, et, comme je l'ai dit plus haut, on rencontre quelquefois le cas où l'un des flacons à moût présente à la fois des moisissures ou des levures et des bactéries. Quant à ces dernières, nous n'osons toutefois pas, dans ce cas-là, conclure directement que ce sont des bactéries de moût, c'est-à-dire des bactéries qui peuvent se développer dans le moût comme tel; car il est possible que leur évolution date seulement du moment où le moût, ayant été transformé par l'activité vitale des moisissures ou des levures, n'est plus ce que nous comprenons par moût, et il est possible que cette évolution n'eût pas eu lieu, si les susdits organismes n'avaient point été présents en même temps. C'est pourquoi je n'ai point compris de pareils cas dans mes expériences.

Après avoir séjourné à une température d'environ 25° C., les uns pendant 14 jours, d'autres pendant 7 jours, les flacons, tant ceux de moût que ceux de bière, infectés à l'eau d'essai, furent examinés soit à l'œil nu, soit au microscope, et je notai le nombre des flacons infectés, ainsi que le contenu observé. Puis je supputai le nombre de végétations de divers organismes pour chaque centimètre cube d'échantillon d'eau. Ces séries d'expériences étaient au nombre de 100, les échantillons ayant été pris, comme je l'ai fait remarquer plus haut, les uns (50) dans les conduits du laboratoire, les autres (50) dans les deux brasseries. Dans les résultats que la section suivante communique sous le titre A, je n'ai compris ni certaines autres séries d'expériences (18) que j'ai

entreprises avec l'eau filtrée dans un filtre à charbon, ni telles autres analyses isolées (3) faites dans un but spécial. Quant aux renseignements fournis par ces dernières expériences, il en est parlé ailleurs dans ce mémoire.

## II. Résultats.

### A. Parmi les organismes présents dans l'eau, quels sont ceux qui peuvent se développer dans le moût et dans la bière; lesquels rencontre-t-on le plus souvent et quel est leur coefficient numérique (le nombre de végétations par 1 cmc)?

Durant mes expériences, j'ai vu apparaître, dans le moût et la bière, des bactéries, des moisissures et des cellules ressemblant à des Saccharomyces (espèces de Torula et de Mycoderma), mais aucune espèce de Saccharomyces. Les organismes les plus fréquemment rencontrés dans le moût, étaient les bactéries et les moisissures, tandis que les cellules ressemblant à des Saccharomyces étaient de beaucoup plus rare occurrence. Dans la bière douée d'une propriété désinfectante beaucoup plus considérable, ces mêmes formes ont apparu, mais en plus petit nombre.

Dans les deux tableaux ci-dessous, j'ai donné, tant pour la part du moût que pour celle de la bière, un aperçu du résultat de mes analyses relatives aux conduits soit du laboratoire, soit des deux brasseries. Dans le premier tableau, les moyennes de toutes les séries d'expériences indiquent le nombre de végétations qui se sont développées dans les susdits liquides par voie de semence puisée dans 1 cmc d'eau. Dans l'autre tableau, au contraire, les moyennes indiquent la fréquence d'apparition de ces végétations, c'est-à-dire dans combien de séries d'expériences ces végétations ont été trouvées.

**Tableau I.**

| | Laboratoire | | Brasserie principale | | Brasserie annexe | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Moût | Bière | Moût | Bière | Moût | Bière |
| Bactéries | 2.9 | 0.08 | 1.3 | 0.03 | 0.9 | 0.03 |
| Moisissures | 2.4 | 0.7 | 3.1 | 1.0 | 1.3 | 0.3 |
| Cellules ressemblant à des Saccharomyces | 0.4 | 0.09 | 0.4 | 0.01 | 0.3 | 0.02 |

**Tableau II.**

| | Laboratoire | | Brasserie principale | | Brasserie annexe | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Moût | Bière | Moût | Bière | Moût | Bière |
| Bactéries | 68% | 18% | 68% | 12% | 56% | 4% |
| Moisissures | 86% | 84% | 96% | 100% | 64% | 44% |
| Cellules ressemblant à des Saccharomyces | 34% | 24% | 28% | 8% | 32% | 8% [1] |

**B. Trouve-t-on, parmi ces organismes, des bactéries, de vrais Saccharomycètes et autres cellules ressemblant à des Saccharomyces et, en général, des espèces nuisibles au moût et à la bière?**

Nous voici arrivés à la question de savoir si quelques-uns des types qui méritent un intérêt special, ont été révélés par les analyses, et surtout à la question que voici: Y a-t-il, oui ou non, de véritables Saccharomycètes (levures de brasserie ou levures sauvages)? La réponse est négative. Je n'ai jamais réussi à trouver, parmi les cellules ressemblant à des Saccharomyces, d'autres types que des espèces de Torula (entremêlées de types rouges) et le Mycoderma cerevisiæ. Quant aux phénomènes de fermentation dans le moût, les types trouvés ne les ont jamais produits. Assez longtemps, il n'a pas été rare de rencontrer, en fait de bactéries, une des espèces qui transforment en une substance très cohérente et filante la masse entière du moût contenu dans le flacon. Ces espèces ont été décrites par M. H. van Laer sous le nom de Bacillus

[1] Si nous voulons découvrir la raison du fort développement des moisissures (et bactéries) constaté dans les flacons à moût et à bière infectés avec de l'eau de la brasserie principale, comparativement à l'évolution qu'a produite l'infection des susdits liquides au moyen de l'eau de la brasserie annexe, il faut chercher cette raison dans le fait que les réservoirs d'eau de la brasserie principale sont à proximité des magasins de grain et de malt. On sait que, dans ces magasins, la surface des grains d'orge est couverte d'une foule de spores de moisissures (et bactéries), que le nettoyage et le pelletage du grain fait circuler avec les divers courants d'air et qui peuvent facilement se réfugier dans les réservoirs d'eau installés dans le voisinage. Dans la brasserie annexe, au contraire, cet état de choses n'existe pas. La différence se manifeste d'ailleurs dans toute son évidence par l'examen des tableaux I et II, p. 112—113. C'est là un bel exemple de l'emploi des expériences scientifiques pour obtenir des résultats pratiques, et nous y trouvons une suggestion relative au procédé qu'il est préférable de suivre quand il s'agit d'établir des réservoirs d'eau dans une brasserie.

viscosus I et II. Dans un certain nombre d'analyses, les flacons à bière ont présenté les Bact. aceti et Bact. Pasteurianum Hansen. Je n'ai point trouvé les Sarcina, mais d'après une communication verbale, due à l'obligeance de M. A. Jörgensen, on les a trouvés dans les analyses d'eau qui se font très fréquemment dans son laboratoire. Le moût infecté de bactéries ne subissait parfois qu'une opalisation sans odeur particulière bien accusée; d'autres fois c'était une décoloration plus ou moins forte et souvent accompagnée d'une formation de membrane, auquel cas le moût affectait une odeur particulière, le plus souvent désagréable, soit acidule, soit douceâtre et nauséabonde. Quelquefois le moût était filant, comme je l'ai fait remarquer plus haut.

### C. Influence de divers facteurs sur l'évolution des végétations de l'eau.

Nous arrivons maintenant à quelques-uns des facteurs qui exercent une influence sur la quantité des germes survenus, et il faut alors nous arrêter principalement sur la question de l'influence de la température.

Les microorganismes présents dans l'eau et susceptibles de développement dans le moût et dans la bière, apparaissent-ils en nombre égal aux diverses périodes de l'année, ou bien y a-t-il des époques où leur nombre est particulièrement grand et, alors, quelles sont ces époques?

Mes recherches ont révélé que, d'une part, le nombre de germes était loin de se maintenir uniforme aux diverses époques et pour la même eau, tandis que, d'autre part, — comme aussi on devait s'y attendre, — les saisons n'introduisaient aucune augmentation ou diminution régulière du nombre des organismes en question.

Il y a donc d'autres facteurs qui ont causé les oscillations aux différentes époques de l'année et même de jour en jour; il faut y comprendre vraisemblablement la chute variable des eaux de l'atmosphère, l'afflux de l'eau des couches superficielles, le contact avec l'air atmosphérique et, en outre, pour la part de quelques analyses, l'état anormal du puits ou des réservoirs (en raison des travaux qui s'y faisaient). Ces deux dernières circonstances, par exemple, ont longtemps suscité une plus grande affluence de microorganismes dans les analyses de l'eau des conduits du laboratoire, tandis que le contact avec l'air atmosphérique a causé le développement considérable des moisissures dans les flacons infectés avec l'eau des conduits de la brasserie principale.

Je vais traiter d'abord l'état des choses relativement à l'ensemble des germes: bactéries, moisissures et cellules ressemblant à des Saccharomyces; puis je considérerai les conditions relatives à chacun des

susdits groupes de microorganismes pris séparément, et je chercherai à en tirer quelques conclusions, autant qu'il sera possible de le faire à l'aide des matériaux en main, qui pourtant sont bien insuffisants pour le but.

En parcourant les diverses séries d'expériences je suis arrivé à ce résultat qu'il s'était produit de continuelles oscillations, et qu'il serait à peine possible de décider à quelles époques de l'année a dû avoir lieu le plus fort développement, à quelles époques la plus faible évolution.

J'ai aussi recherché l'état de choses relatif aux groupes mentionnés, chacun à part, et, relativement aux bactéries, j'ai trouvé le résultat que voici: le nombre de bactéries capables de se développer dans le moût et dans la bière, est à peu près le même dans le cours entier de l'année.

Les moisissures ont donné le résultat suivant. Ici, c'est dans les mois de juillet, août et septembre qu'on eut un maximum; durant les autres mois, les nombres ne varièrent pas beaucoup, bien qu'ils fussent particulièrement petits pendant les mois d'hiver (octobre — décembre).

Enfin, relativement aux cellules ressemblant à des Saccharomyces, voici ce que j'ai trouvé. Ici encore, les oscillations étaient faibles et, soit dans les mois d'hiver et de printemps, soit dans ceux de l'été et de l'automne, j'ai trouvé à la fois des maxima et des minima alternants.

### D. Importance pratique des expériences.

Les recherches ci-dessus nous ont fait connaître lesquels des organismes de l'eau peuvent se trouver dans le moût et dans la bière et devenir nuisibles; de plus, en quelle quantité ces types se produisent généralement et quelle est la fréquence de leur rencontre dans les analyses. Dans les circonstances normales, leur nombre n'est, à la vérité, pas grand, mais, comme le démontrent quelques-unes de mes séries d'expériences, il peut s'élever considérablement. Dans ce dernier cas il s'agit de remonter aux causes.

On sait qu'à une certaine profondeur l'eau du sol est exempte de germes, mais il est rare qu'elle se trouve encore dans cet état de pureté quand elle atteint le lieu où nous aurons à l'utiliser; car, en route, il lui parvient des germes provenant soit de la couche d'eau superficielle, soit de l'air: c'est pourquoi, fréquemment, l'analyse de l'eau devient aussi une analyse de l'air. Les germes bactériens transférés à l'eau, tant par la couche supérieure du sol que par l'air même, succomberont sans doute par l'effet de leur antagonisme avec les bactéries spécifiques de l'eau et, par conséquent, l'apparition d'une partie con-

sidérable de bactéries que le forage, par exemple, ou l'excavation introduit dans un puits, finira par cesser quand la cause de cette apparition sera suspendue. C'est précisément là qu'en était le puits qui alimente d'eau le laboratoire et en partie la brasserie principale. L'insuffisance du débit fit entreprendre dans ce puits divers travaux qui durèrent la plus grande partie de l'été, tout l'automne et l'hiver de 1888, et ne furent terminés qu'au commencement de 1889. Durant ces travaux, et quelque temps après, l'eau fut mauvaise, zymotechniquement parlant, et c'étaient surtout les bactéries du moût qui se produisaient en grande quantité. Néanmoins, ce grand nombre de bactéries baissa peu à peu, et nous fûmes alors fondés à croire que nous avions simplement à faire avec les germes particuliers à cette eau-là, si toutefois, bien entendu, les conduits et réservoirs étaient en état. Je ferai cependant remarquer ici que la susdite eau, elle aussi, avait été mauvaise avant qu'on eût commencé à travailler au puits; mais la cause en était dans divers inconvénients inhérents au réservoir et qui, toutefois, furent levés. Ils étaient dus partiellement à la forte chaleur qui régnait dans le local où se trouvait le réservoir, chaleur émanant des machines installées dans le voisinage immédiat de ce réservoir, et partiellement à ce que la vapeur d'échappement affluait dans le tuyau de décharge du réservoir, ce dernier tuyau débouchant dans un tuyau d'échappement de la vapeur. Cela rendait humide et chaud le couvercle du réservoir, couvercle qui, étant en bois, devenait le foyer de génération des microorganismes.

Si l'eau employée vient du sol et n'est point mêlée d'eau provenant de la surface et que ses puits, conduits et réservoirs soient en état et fréquemment nettoyés à fond, l'on n'aura qu'un faible développement, tant de bactéries que d'autres microorganismes, soit dans le moût, soit dans la bière: sous ce rapport, je puis renvoyer aux résultats de mes analyses de l'eau provenant des conduits de la brasserie annexe. Cette eau peut en effet servir comme type d'eau très propre à l'usage d'une brasserie.

Si maintenant nous voulons examiner de plus près les conséquences qui, en sus des remarques précédentes, peuvent se tirer des expériences ayant de l'importance pour la pratique en grand, pour l'industrie du brasseur, il nous faut considérer le résultat dans ses relations avec les trois grands procédés du maltage, du brassage et de la fermentation. Y a-t-il danger pour que l'emploi de l'eau de brasserie ait lieu au détriment de l'exploitation de quelqu'une de ces trois branches? D'abord, à l'égard du malt, la question de la présence des microorganismes dans l'eau de la cuve à tremper en est à ce point que c'est à peine si ces germes ont à jouer ici un rôle appréciable, car les grains d'orge introduisent eux-mêmes une infinité de germes par leur contact avec l'eau

dans les cuves à tremper; en outre, plus tard, durant le procédé du brassage, ces organismes sont tués par la cuisson du moût. C'est au contraire dans les caves de fermentation et de garde que le danger existe constamment, mais son importance y diminue, surtout pour la cave de fermentation, en raison de l'antagonisme dû à la présence constante de levures très abondantes, et, quant à la cave de garde, en raison de la température extrêmement basse qui y règne.

Pour apprécier pratiquement la qualité de l'eau, il est d'une importance particulière qu'on sache si l'apparition (dans les flacons à moût et à bière) des microorganismes et surtout des bactéries semées dans ces flacons par une analyse d'eau, est précoce ou tardive. En effet, il est clair que les organismes dont l'apparition a lieu seulement 4 ou 5 jours après le début de l'expérience, doivent être affaiblis au point de n'en arriver que très difficilement, ou point du tout, à se développer dans les conditions qu'imposent les opérations de la brasserie; car, à plus d'un égard, les expériences du laboratoire placent ces organismes dans des conditions plus favorables qu'ils ne les trouvent dans la brasserie: d'une part, ils peuvent se développer sans concurrence de la part de la levure; d'autre part, la température à laquelle ils sont exposés est, pour la majorité d'entre eux, la meilleure de toutes. Faire des expériences avec des flacons à basse température et en concurrence avec de la levure de bière, comme l'a proposé M. Prior (Bayr. Brauer Journal n° 7, 1891), serait insignifiant, car ces conditions n'en répondraient pas mieux à ce qui se passe dans la brasserie, que le procédé employé par moi. Une fermentation dans de petits flacons contenant du moût stérilisé, ne peut naturellement pas être la même chose qu'une fermentation dans les grandes cuves de la cave de fermentation, ni que le séjour ultérieur dans les caves de garde.

Bien que les moisissures aient le plus grand coefficient de fréquence d'apparition et ordinairement aussi d'abondance dans les analyses de moût, leur importance reste assurément faible.

Les bactéries dont les analyses faites avec du moût comme liquide nourricier ont constaté la présence dans 56 à 68% des séries d'expériences, sont mises en contact avec le levain pendant le lavage, et passent avec lui dans les cuves de fermentation où elles peuvent continuer à se développer. Une partie d'entre elles passe avec la bière dans la cave de garde, d'autres restent dans le dépôt de la levure et sont retransportées avec la nouvelle levure d'ensemencement dans le moût, et là, surtout à mesure qu'elles deviennent plus nombreuses, eur présence peut avoir une influence extrêmement nuisible. Il est vrai que dans la cave de garde le danger d'une évolution ultérieure ne sera point aussi grand, car la température y est basse; mais quand

une bière infectée de bactéries morbifères, est soutirée et, par là, exposée à l'air et soumise à une température plus élevée, la maladie fait des progrès si rapides qu'au bout de peu de temps la bière devient tout à fait invendable.

Quant aux espèces de Sarcina, qui d'après M. Lindner (Die Sarcinaformen der Gährungs-Gewerbe) sont capables de détériorer la bière, mais peuvent aussi rester tout à fait inactifs dans ce sens (A. Petersen: Sarcina im Biere ohne irgend welche Krankheitsphänomen. Zeitschr. f. das ges. Brauwesen n° 1, 1890, et A. Jörgensen: Sarcina. Allg. Brauer und Hopfen Zeitung n° 115, 1890), je ne les ai point trouvées dans mes analyses d'eau: cependant M. A. Jörgensen a eu l'obligeance de me communiquer de vive voix qu'elles ont été trouvées, comme je l'ai fait remarquer plus haut, dans quelques-unes des analyses d'eau entreprises dans son laboratoire.

Pour pouvoir formuler un jugement sur une eau de brasserie, le zymotechnicien doit avoir une échelle sur laquelle il puisse se régler. Le résultat qui intéresse le brasseur, n'est point le nombre d'organismes trouvés dans chaque centimètre cube, mais bien, si l'eau est bonne ou mauvaise au point de vue zymotechnique. C'est donc là qu'il faut une échelle, et on la trouve dans mes expériences communiquées ici et concernant les conduits et réservoirs, tant des deux brasseries que du laboratoire. L'eau de la brasserie annexe doit être déclarée bonne, celle de la brasserie principale encore utilisable et celle du laboratoire zymotechniquement mauvaise. Dans son analyse faite en 1888, M. Hansen est arrivé à un autre résultat, l'eau des conduits du laboratoire donnant alors une faible proportion de bactéries.

En dernier lieu, j'ai aussi traité empiriquement la question de l'importance que pouvait avoir la filtration de l'eau.

Mes expériences, dans lesquelles je me servais de filtres à charbon ordinaires, ont donné pour résultat que l'eau filtrée donnait en général un beaucoup plus grand développement d'organismes, soit dans le moût, soit dans la bière, soit dans les gélatines nourricières que l'eau de même provenance avant le filtrage. Il va de soi que l'application de ces filtres aux opérations pratiques d'une brasserie n'est point à recommander. Ici encore la méthode de la gélatine a révélé, après l'ensemencement soit avec l'eau filtrée, soit avec l'eau non filtrée, un nombre de végétations démesurément grand en comparaison du nombre des végétations qui ont paru, tant dans le moût que dans la bière, après l'ensemencement fait avec le même échantillon d'eau. J'ai constaté en même temps que les espèces arrivées à développement dans les gélatines nourricières, n'étaient point les mêmes que celles qui ont surgi dans les cultures

faites avec les deux liquides précités. Cette méthode, par conséquent, est impraticable dans les recherches zymotechniques; mais, dans les expériences où il s'agit d'éprouver la bonté des filtres, c'est au contraire cette méthode-là qu'il faut préférer en raison du fort développement qu'elle suscite.

Je vais encore citer ici quelques-unes des expériences mentionnées ci-dessus:

I. La gélatine mélangée de peptone a donné environ 8000 colonies par cmc. La plupart, colonies de bactéries.

La gélatine mélangée de moût a donné environ 14 colonies par cmc. Moisissures.

Le moût a donné environ 5.4 colonies par cmc. Bactéries et moisissures.

La bière a donné environ 0.8 colonies par cmc. Moisissures.

II. La gélatine mélangée de peptone a donné environ 350 colonies par cmc. Bactéries.

La gélatine mélangée de moût a donné environ 8 colonies par cmc. Moisissures.

Le moût a donné environ 5.3 colonies par cmc. Bactéries et moisissures.

La bière a donné environ 0.8 colonies par cmc. Moisissures.

III. La gélatine mélangée de peptone a donné environ 370 colonies par cmc. Bactéries.

La gélatine mélangée de moût a donné environ 4 colonies par cmc. Bactéries.

Le moût a donné environ 1.1 colonies par cmc. Moisissures et Torula.

La bière a donné environ 0.4 colonies par cmc. Moisissures.

La dernière expérience a donc fait voir dans le moût et dans la bière des espèces tout autres que dans les gélatines nourricières.

---

## III. Résumé.

Mon travail a pour point de départ les recherches de M. Hansen sur le procédé à suivre pour l'analyse biologique de l'eau des brasseries. Comme on le sait, il prétendait qu'on doit employer à cet effet le moût et la bière mêmes et rejeter la méthode de la gélatine. Si claire que paraisse son idée, elle n'en rencontra pas moins une forte résistance, surtout immédiatement après qu'il l'eut produite. Mes expériences dans

ce sens ne sauraient donc guère être taxées de superfluité. Elles ont conduit au même résultat qu'a obtenu M. Hansen; aussi ai-je suivi, dans leur partie essentielle, la méthode proposée par lui.

J'ai tout d'abord essayé le procédé, puis scruté la question des limites de temps entre lesquelles les flacons infectés présentent une végétation visible à l'œil nu. Je suis arrivé à ce résultat, que malgré la possibilité d'une pareille végétation après le 7$^{e}$ jour, on n'en doit pas moins considérer comme certain que, dans la majorité des cas, l'évolution des végétations est achevée à ce terme-là et que ce même terme peut servir de clôture aux analyses en ce qui concerne la pratique. Car, plus ces végétations apparaissent tardivement dans les expériences de laboratoire, plus sera faible leur importance en pratique, puisque la perspective de voir se réaliser une évolution dans les circonstances où fonctionne une brasserie, est considérablement réduite, tant à cause de la basse température à laquelle ont lieu les opérations, qu'en raison de la concurrence entre cette évolution et la puissante végétation de la levure dans le moût. Dans le même endroit, j'ai pareillement dit que, pour les expériences, on peut se limiter à l'emploi du moût, parce que tous les organismes qui arrivaient à développement dans la bière, peuvent aussi se développer dans l'autre liquide nourricier. Finalement j'ai montré les résultats erronés auxquels on arrivera en appliquant à ces recherches la méthode de M. Koch, dite à la gélatine, au lieu d'employer le moût et la bière, comme l'a indiqué M. Hansen. S'agit-il au contraire de vérifier la bonté d'un filtre, le procédé à la gélatine est excellent.

Dans la seconde section de mon mémoire, j'ai décrit mes analyses et les résultats qu'elles ont donnés. On a constaté que les moisissures étaient les organismes qui parvenaient le plus fréquemment à se développer dans le moût et dans la bière et constituaient aussi, en général, l'élément qui, sous le rapport numérique, prédomine dans les végétations de chaque série d'expériences. Après les moisissures, les organismes les plus fréquemment observés étaient les bactéries, quand le moût servait de liquide d'essai, tandis que, dans la bière, leur développement était rare. Le contingent de végétations bactériennes fourni par chaque série d'expériences était aussi, en général, inférieur à celui des moisissures. Le cas le plus rare fut celui des cellules ressemblant à des Saccharomyces, et le nombre des végétations dans lesquelles on a observé ces cellules, fut aussi le plus faible en comparaison du chiffre qu'ont donné les autres organismes.

Dans mes séries d'expériences, je n'ai jamais observé de Saccharomycètes, mais, en fait de cellules ressemblant à des Saccharomyces, j'ai vu des espèces de Torula et de Mycoderma cerevisiæ, et, en fait de bactéries, les bactéries de l'acide acétique (B. aceti et B. Pasteurianum) ainsi qu'une forme rendant le moût glaireux et filant (B. viscosus) et assez souvent des espèces donnant au moût une odeur désagréable et nauséabonde. La Sarcina ne s'est point montrée, mais la possibilité de son apparition dans de pareils échantillons d'eau ressort des analyses entreprises dans le laboratoire de M. A. Jörgensen.

Le nombre de microorganismes qui se développèrent dans le moût et dans la bière, ne fut pas le même aux différentes époques de l'année pour une même eau, et je ne constatai non plus aucun rapport régulier entre les saisons et la hausse ou la baisse du nombre des espèces en question. La diversité des précipités de l'atmosphère, l'afflux des eaux de la surface, le contact de l'air atmosphérique, outre l'état anormal des puits, conduits et réservoirs, tels furent vraisemblablement les facteurs qui firent varier le nombre des germes.

En ce qui concerne l'ensemble des germes (bactéries, espèces de Torula et moisissures) j'ai constaté qu'il se produisait de continuelles oscillations et qu'il était impossible de décider à quelles époques avait lieu le plus fort développement, à quelles époques se trouvait la moindre évolution. En examinant l'état des choses par rapport à chaque groupe pris séparément, j'ai trouvé que pour la part des bactéries, leur nombre se maintenait à peu près égal durant l'année entière, tandis que les moisissures présentaient un maximum en juillet, août et septembre, et un minimum durant les mois d'hiver, octobre—décembre. Enfin, relativement aux cellules ressemblant à des Saccharomyces, j'ai constaté, soit durant les mois d'hiver et de printemps, soit dans ceux de l'été et de l'automne, un alternat entre leurs maxima et leurs minima.

En parlant de l'importance pratique des expériences, j'ai trouvé, entre autres, l'occasion de faire ressortir l'influence capitale qu'exerça sur les analyses de l'eau provenant de la brasserie principale du vieux Carlsberg, le fait que les réservoirs d'eau de cette brasserie étaient installlés dans le voisinage des magasins de grain et de malt; car dans les eaux qu'on y traita, il se forma une quantité de végétations de moisissures beaucoup plus considérable que dans l'eau analysée provenant des réservoirs du laboratoire et de la brasserie annexe. Il n'est donc point insignifiant pour une brasserie de savoir où établir ses réservoirs. Relativement aux trois grandes opérations du maltage, du brassage et de la fermentation, j'ai fait ressortir qu'à proprement parler,

c'est seulement durant cette dernière que les germes présents dans l'eau et capables de se développer dans le moût et dans la bière, peuvent en arriver à jouer un rôle important. Malgré la fréquence des moisissures, leur importance reste encore secondaire. Ce qui est surtout dangereux, ce sont les bactéries, et principalement dans la cave de fermentation, tandis que, en général, elles ne peuvent point se développer notablement dans la bière de la cave de garde; mais quand le soutirage aère la bière et que la mise en bouteilles ou en petits tonneaux l'expose à une température plus élevée, ces microorganismes peuvent se développer avec une rapidité prodigieuse et causer grand dommage.

Pour le zymotechnicien qui doit entreprendre de pareilles analyses, il est important d'avoir une échelle relative pour juger si l'eau est bonne ou non à l'usage des brasseries. C'est à quoi je crois avoir abouti par mes séries d'expériences sur les eaux respectives du laboratoire, de la brasserie principale et de la brasserie annexe (voir le tableau I, p. 112). J'ai présenté l'eau de la brasserie annexe comme un type d'eau bonne, l'eau de la brasserie principale comme encore utilisable et l'eau du laboratoire comme mauvaise. A l'égard du laboratoire et, en partie aussi, concernant la brasserie principale, je dois pourtant rappeler ici les conditions extrinsèques défavorables, surtout les travaux considérables entrepris dans le puits à l'époque où j'ai fait mes analyses: c'est évidemment là qu'il faut chercher la cause du développement extraordinairement fort des végétations et surtout des bactéries. Les analyses que dans le temps M. Hansen a faites de l'eau prise au même puits et aux mêmes réservoirs, ont été entreprises dans des circonstances plus favorables, et ont aussi donné un meilleur résultat.

Finalement j'ai traité la question de savoir si le filtrage de l'eau à l'aide de filtres ordinaires au charbon pourrait aboutir heureusement. Il en est toutefois résulté qu'en général l'eau filtrée donnait un beaucoup plus fort développement, soit dans le moût et dans la bière, soit dans les gélatines nourricières, que la même eau non filtrée.

Ici j'ajouterai une seule remarque, savoir qu'en raison de mon but principal, qui est de donner les analyses d'eaux diverses, le présent travail s'écarte, sous un rapport, de celui de M. Hansen, tandis que, d'autre part, il s'y rattache et y supplée, la tâche de cet auteur étant l'examen des principes pour ce genre de recherches.

# Recherches faites dans la pratique de l'industrie de la fermentation.

(Contributions à la biologie des microorganismes).

Par

**Emil Chr. Hansen.**

—

V.

## Sur l'analyse zymotechnique des microorganismes de l'air et de l'eau.

Dans le journal présent (vol. 1, 2e livr. 1879 et 4e livr. 1882) j'ai publié une série de recherches sur les espèces de microorganismes aériens capables de faire surgir des végétations dans le moût de bière, recherches portant aussi sur l'apparition de ces microbes à différentes époques de l'année, aussi bien dans les locaux des brasseries qu'à l'air libre. Dans ce travail, comme plusieurs autres de mes œuvres, il y a une étroite liaison entre les études théoriques et celles dont le caractère est purement pratique. Les lecteurs qui s'intéresseraient à la question, sont priés de se reporter soit aux résumés français dont il est fait citation, soit à l'édition allemande complète de mes „Untersuchungen aus der Praxis der Gährungsindustrie". 2e livr. Éd. Oldenbourg, Munich 1892. Dans cette 2e livraison, j'ai mis en relief les recherches qui ont, en pratique, une importance particulière, et j'y ai rattaché quelques observations et remarques nouvelles[1]).

---

Tout le monde est d'accord que l'examen biologique de l'eau de brasserie doit se faire d'après les mêmes principes que celui de l'air. Il semble aussi aller de soi que, dans les essais de culture requis par ces examens, l'on emploie précisément les mêmes liquides que dans la fabrication de la bière. Cependant il ne règne pas sur ce dernier point un

[1]) Des éditions complètes en Français et en Anglais de mes „Recherches faites dans la pratique de l'industrie la fermentation" sont en préparation.

accord complet. Surtout de 1885 à 1890, il y avait plusieurs bactériologues éminents qui n'envisageaient aucunement ainsi la question. A cette époque-là, on entreprenait de tous côtés, d'après la méthode de M. Koch, dite procédé à la gélatine, une foule d'expériences sur la richesse de l'eau en microorganismes, non seulement dans les laboratoires d'hygiène, mais encore dans ceux de zymotechnie.

Ceci me fit aussitôt l'effet d'une grande erreur, et après avoir fait les expériences nécessaires dans ce sens, je relevai le gant, et publiai, en 1888, un petit traité; mais, durant ce même temps, les opérateurs de la plupart des laboratoires zymotechniques s'étaient tellement habitués à procéder exclusivement d'après la méthode hygiénique de M. Koch, qu'il était très difficile de susciter une modification à cet égard. On avait adopté à l'étourdie cette méthode, sans examiner préalablement si cette voie pouvait réellement mener à la solution des questions posées par la zymotechnie.

C'est à dessein que je n'ai pas voulu revenir plus en détail sur les débats que je me suis attirés par mon travail, car ils ont cessé d'exciter suffisamment l'intérêt. De plus, dans ces dernières années, des laboratoires de différents pays se sont ralliés à moi en nombre de plus en plus grand. Dans la 2e livraison de mes „Untersuchungen der Praxis der Gährungsindustrie" sus-mentionnées, j'ai présenté, sous une forme élaborée, mes recherches dans ce sens, et j'espère pouvoir les conclure par là. Le présent résumé ne donnera qu'un aperçu des points les plus importants. Les détails et preuves spéciales se trouvent dans l'édition complète précitée.

La méthode indiquée par M. Koch pour l'analyse bactériologique de l'eau potable, consiste à mélanger $1^{cmc}$ de l'eau avec $10^{cmc}$ de gélatine nourricière (gélatine mélangée d'extrait de viande et de peptone) rendue liquide après avoir été portée à 30° C. Ce mélange, versé sur une plaque, est garanti contre l'infection du dehors à l'aide d'une cloche tenue humide. Parfois on n'emploie que $^1/_2{}^{cmc}$, ou bien seulement une goutte de cette eau. On conserve les plaques à la température du local, et les examine au bout de 3 ou 4 jours. Pour des raisons pratiques, on estime le nombre de colonies de végétations développées pour $1^{cmc}$ de l'eau examinée.

Quand un brasseur demande une analyse bactériologique de l'eau qu'il doit employer dans sa brasserie, il ne s'agit pas de trouver quels sont les microorganismes qu'on y rencontre en général, ni de savoir quelles végétations se développent dans la gélatine ou dans tel autre milieu nourricier solide additionné ou non d'extrait de viande et de peptone: tout cela est ici sans intérêt, car la brasserie ne se sert ni de l'une ni de l'autre de ces substances. La question qu'on nous pose

est au contraire simplement celle-ci: Comment l'eau se comporte-t-elle vis-à-vis du moût et de de la bière? Quelle est sa teneur en microorganismes capables d'évolution dans ces liquides nourriciers, et y a-t-il parmi eux des espèces capables de causer des perturbations dangereuses pour l'exploitation?

Partant de ces points de vue j'ai fait une série d'expériences comparatives.

Les liquides nourriciers, bière et moût, furent décantés à part dans de petits matras à bouchons de coton (matras Chamberland ou flacons Freudenreich). J'employai des matras contenant 22$^{cmc}$, et fis passer dans chacun d'eux environ 10$^{cmc}$ du liquide. Un assez grand nombre d'entre eux fut stérilisé à la fois et sous pression dans un appareil à vapeur. 1$^{cmc}$ d'eau prise à un conduit de l'eau froide a donné pour les cultures de bière de toutes les séries d'expériences .......................................... 0 végétations.

Pour les cultures de moût de la 1$^{re}$ série d'expériences.. 0 —
— — — 2$^{e}$ — — .. 0 —
— — — 3$^{e}$ — — .. 6,6 —
— — — 4$^{e}$ — — .. 3 —
— — — 5$^{e}$ — — .. 9 —

tandis que, dans la gélatine de Koch, on vit se développer en 1$^{cmc}$ des mêmes échantillons d'eau

dans la 1$^{re}$ série d'expériences .................. 100 végétations
— 2$^{e}$ — — .................. 222 —
— 3$^{e}$ — — .................. 1000 —
— 4$^{e}$ — — .................. 750 —
— 5$^{e}$ — — .................. 1500 —

Inutile de dire que ces derniers chiffres doivent être considérés comme dénués de valeur pour l'analyse de brasserie. L'analyse prenait un caractère un peu meilleur, si, au lieu de la gélatine mélangée d'extrait de viande et de peptone, on employait la gélatine au moût; mais, dans ce cas aussi, les chiffres sont trop forts et ne nous donnent pas non plus d'éclaircissements utilisables. La majeure partie des bactéries développées dans les cultures de gélatine ne se reproduisaient ni dans la bière ni dans le moût et, par conséquent, n'ont aucune importance pour notre but.

Autre objection sérieuse contre l'emploi de la gélatine: il arrive souvent que quelques-uns des microorganismes, ceux-là mêmes qui, en pratique, ont la plus grande importance pour notre analyse, ne se développent pas du tout dans la gélatine.

## VI.

# Nouvelles recherches sur les maladies provoquées dans la bière par des ferments alcooliques.

(Deuxième mémoire).

### 1. Introduction.

Mon premier mémoire sur le sujet qui forme le titre, a été publié dans les Comptes rendus du laboratoire de Carlsberg vol. II, 2e livr. 1883. A cette époque, je n'avais pas encore entrepris la division en deux séries que j'ai plus tard introduite dans mes recherches sur les organismes de la fermentation; c'est pourquoi ce même mémoire se trouve enclavé dans les „Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques", bien que sa teneur le rattache de plus près à la nouvelle série qu'en 1888 j'ai commencé à publier sous le titre de „Recherches faites dans la pratique de l'industrie de la fermentation". En 1884, j'ai publié, dans la „Zeitschrift für das ges. Brauwesen", une communication sur de nouvelles études dans le sens susindiqué. Mais ces travaux ne contiennent que les résultats principaux fournis par mes expériences faites il y a huit ans, et contiennent la promesse d'une exposition ultérieure plus explicite, ainsi que d'un traitement de la question sur ses diverses faces. Depuis lors, j'ai aussi continué ces recherches à des intervalles plus ou moins longs, et fait à cette occasion plus de 50 séries d'expériences. Je crois être arrivé, tout au moins par le moment, à la clôture de ces expériences, et en publiant aujourd'hui le présent travail, je me suis efforcé d'y tenir les deux promesses que j'avais données dans les deux communications provisoires ci-dessus désignées.

Celles de mes recherches qui ont une importance directe pour l'industrie de la fermentation, se groupent sous trois thèses principales: la question des maladies de la bière, celle de la culture pure de la levure et celle d'employer des espèces ou races de levure choisies systématiquement.

C'est la solution obtenue en traitant la première question qui m'a fourni l'occasion de comprendre dans ces études pratiques les deux autres questions. Car, si j'avais constaté que les levures alcooliques ne causent aucune maladie, c'est à peine si j'aurais trouvé quelque raison péremptoire pour introduire dans l'industrie de véritables cultures pures, ni, par conséquent, pour faire un choix méthodique d'une espèce ou d'une race déterminée.

La question des maladies de la bière et autres liquides fermentés a donc une grande importance. Le chapitre qui suit, présente le

premier essai sur l'histoire de cette question. Le résumé qui vient après, ne contient que les points principaux. L'exposé in extenso se trouve dans mes „Untersuchungen aus der Praxis der Gährungsindustrie", 2e livrais. Munich 1892.

## 2. Comment la doctrine des maladies des liquides fermentés s'est développée peu à peu.

On doit se rappeler que, en parlant ici de maladies, nous comprenons par là les altérations défavorables que les liquides fermentés, surtout la bière et le vin, peuvent subir en conséquence de l'attaque faite sur eux par des microorganismes. Il y a une étroite liaison entre les recherches sur les maladies des liquides fermentés et la grande question de la génération spontanée (generatio æquivoca).

De tout temps il y a eu des naturalistes fauteurs de cette conception. De 1745 à 1756, elle reprit une nouvelle vie dans les écrits publiés par Needham. Une de ces expériences consista à exposer à une forte chaleur un extrait de viande mélangé d'eau dans des matras bouchés. Or, l'évolution d'organismes y ayant eu lieu quand même, il attribua leur production à une génération spontanée. Buffon et un grand nombre d'autres savants adhérèrent à sa doctrine.

Mais il surgit aussi des adversaires, parmi lesquels le plus important fut Spallanzani. Ce savant conclut de ses expériences qu'aucune génération n'avait lieu, et que les germes ou, comme il les appelait, les œufs d'où se développaient les microorganismes, se trouvaient dans l'air, l'évolution se poursuivant, lorsque l'air avait accès aux décoctions sur lesquelles expérimentaient tant lui que Needham.

Dès 1782, l'illustre chimiste suédois Scheele avait appliqué en pratique les expériences de Spallanzani; car il publia alors une méthode pour conserver le vinaigre[1]), le procédé consistant à mettre le vinaigre dans des bouteilles qu'on bouche bien et qu'on place dans un vase contenant de l'eau. Puis on chauffe l'eau et, après une courte ébullition, on enlève les bouteilles. Le vinaigre traité de cette manière peut, au dire de Scheele, se conserver un an et plus sans louchir ni se gâter. C'est cette même méthode qu'on emploie aujourd'hui.

---

[1]) Carl Wilh. Scheele: Anmärkningar om sättet at conservera Ättika (Kongl. Vetenskaps Academiens nya Handlingar. Tom. III. Stockholm, 1872, p. 120). Ce mémoire a paru en français, comme l'indique M. Pasteur, dans les „Mémoires de Chimie" de Scheele, Dijon, 1785. Peu après la mort de Scheele, ses œuvres furent aussi publiées en d'autres langues.

Au commencement de notre siècle, Appert appliqua en pratique l'expérience de Spallanzani d'une manière analogue à celle de Scheele, décrite précédemment. En 1810, Appert publia un livre remarquable, où il donne explicitement une recette pour conserver les denrées alimentaires par la chaleur.

Dans la quatrième édition française[1]), il donne des instructions détaillées pour l'emploi de l'autoclave, modification de la marmite de Papin. Toutefois cette même édition renferme deux autres sections qui, pour nous, présentent un intérêt encore plus grand à cet endroit; l'une (p. 131) traite du vin, l'autre (p. 167) de la bière.

Appert rapporte que de son temps les vins de France les plus fins ne pouvaient pas même supporter de courtes traversées par mer; certains avaient une telle tendance à se gâter qu'en général il était complètement impossible de les exporter et qu'il fallait les consommer sur le lieu même de leur production. Appert fit subir à ces vins le traitement que voici: on en remplit des bouteilles jusqu'au bas du col, sur quoi ces bouteilles furent hermétiquement bouchées avec des bouchons à ligature en fil de fer. Cela fait, il restait encore entre le bouchon et la surface du vin un petit espace rempli d'air. Ces bouteilles furent alors installées dans un bain-marie dont on éleva avec précaution la température jusqu'à 70°. Certain nombre d'entre elles furent alors chargées sur un navire pour St-Domingue, et à leur retour, au bout de deux années, on les examina. Pour point de comparaison, l'opérateur avait gardé chez lui quelques bouteilles du même vin non chauffé. Ces dernières avaient un goût désagréable, tandis que le vin chauffé était excellent à tous les égards. Son expérience avait donc montré qu'un vin qui en d'autres circonstances se gâtait ordinairement pendant un pareil voyage, en revenait sans détérioration aucune. C'est avec une juste fierté qu'il relève les immenses avantages de son procédé.

Appert traita la bière de la même manière et obtint pareillement un résultat favorable.

Il n'est point à même de fournir une explication de ce qui se passe, à proprement parler, durant le chauffage, et il n'atteint pas plus haut que la constatation de l'anéantissement subi par le principe de la fermentation. Appert vit bien que dans les substances qu'il traitait par la chaleur, il ne se produisait ni fermentation ni putréfaction, mais l'explication n'en fut donné que lorsque Cagniard Latour et Schwann

---

[1]) Le livre de tous les ménages ou l'art de conserver, pendant plusieurs années, toutes les substances animales et végétales; par M. Appert. Quatrième édition. Paris, 1831.

eurent montré que la fermentation est due à l'activité d'êtres microscopiques.

Le procédé Appert pour la conservation du vin et de la bière ne paraît avoir trouvé d'application générale que longtemps après, savoir quand M. Pasteur prit la chose en main. Les efforts de M. Pasteur tendaient surtout à faire généralement adopter le procédé pour le traitement du vin. Son collaborateur, M. Velten, effectua les essais sur la bière. Cette méthode est aujourd'hui répandue dans le monde entier sous le nom de pasteurisation.

Le nom de Scheele fut complètement oublié dans toute cette affaire; il n'y a pas beaucoup de gens qui songent que cette invention si belle et si pratique est due à un Scandinave.

Les expériences de Spallanzani et leurs résultats ne furent reconnus que par un petit nombre; on leur opposa surtout que l'air enfermé dans ces ballons hermétiquement clos, était tant dénaturé par l'ébullition que trop peu abondant pour que la génération pût avoir lieu spontanément.

C'est pourquoi, durant les années 1836—37, Franz Schulze et Theodor Schwann entreprirent, chacun à part, une série d'essais, par lesquels ils prouvèrent que diverses substances très fermentescibles et très putrescibles peuvent se maintenir sans altération quand on les soumet à l'ébullition et qu'on veille à délivrer de ses germes l'air au contact duquel elles ont été exposées. A cette occasion, l'un et l'autre de ces expérimentateurs munirent leurs ballons de bouchons ayant deux trous par chacun desquels passait un tube de verre coudé. Ces tubes servaient à introduire l'air dans le ballon. Dans les expériences de Schulze, l'air aspiré postérieurement à l'ébullition, fut purgé par circulation dans l'acide sulfurique, tandis que Schwann purifiait son air par surchauffage. Les expériences de ces deux savants montrèrent qu'on peut ainsi faire affluer sur de pareilles décoctions, des quantités d'air aussi considérables qu'on le veut, sans qu'il s'y produise de putréfaction, de fermentation, ni d'évolution d'organismes: ces expériences contredisaient donc tout à fait Needham et confirmaient l'exactitude des résultats de Spallanzani.

Les années de 1836—1839 sont remarquables dans l'histoire de la microbiologie, grâce aux recherches par lesquelles Cagniard Latour et Theodor Schwann ont fait époque. C'est que ces expériences fournirent la première preuve que la levure alcoolique consiste en cellules vivantes, et que ces dernières sont la cause de la fermentation alcoolique. Les communications antérieures faites dans ce sens, n'étaient en effet que de vagues présomptions.

A la même époque, Kützing était arrivé à un résultat analogue. Mais, dans son traité sur le même sujet, il ne se borne pas à décrire et à figurer de la levure, il en fait autant pour l'eau mère du vinaigre et pour diverses moisissures[1]). Il a nettement saisi la différence entre les cellules de levure et les cellules de l'eau mère du vinaigre et, si défectueuses que soient ses représentations de ces dernières, elles montrent pourtant que c'est bien lui qui a découvert, déjà à cette époque, l'une des bactéries qui suscitent la formation de l'acide acétique. Comme ce microbe est la cause de la fermentation acide, il lui donne la dénomination systématique d'Ulvina aceti.

Quand le vin et la bière s'aigrissent, nous disons qu'ils sont atteints d'une maladie que nous comptons précisément pour une des pires. C'est dans le mémoire cité plus haut de Kützing que nous trouvons les premières indications de l'origine d'une telle maladie. Toutefois il n'employait pas le terme maladie et, en définitive, il ne pensait point à rendre ses expériences fécondes en résultats pratiques.

On peut en dire autant de Turpin. En 1838, ce savant publia un mémoire[2]) fameux pour son époque et dans lequel, à l'instar de Kützing, il mentionne non seulement les champignons auxquels sont dues la fermentation alcoolique et la formation de l'acide acétique, mais également plusieurs autres microorganismes. Le résultat principal auquel il arrive, est formulé par lui — p. 134 — dans l'énoncé suivant: „Point de décomposition de sucre, point de fermentation sans l'acte physiologique d'une végétation". On savait donc alors qu'il existe divers microorganismes qui suscitent différentes fermentations; mais, de ce temps, on n'avait pas encore pénétré plus avant dans cet état de choses, et, quant à l'origine des êtres microscopiques, Kützing autant que Turpin en avaient une idée tout à fait fausse.

En 1854, Schröder et Dusch firent des recherches importantes. Ils adoptèrent le même mode d'expériences que dans les cas précédents, à cela près que l'un des tubes coudés partant du bouchon du ballon, était garni d'un filtre en coton, à travers lequel ils faisaient pénétrer l'air dans le ballon après l'ébullition. C'était donc par filtrage que l'air se purgeait dans ce cas-là.

Pour l'industrie de la fermentation, ces recherches, aujourd'hui anciennes, sur la génération spontanée, présentent l'intérêt particulier que non seulement elles posèrent les principes de la stérilisation, mais

[1]) Kützing, Microscopische Untersuchungen über die Hefe und Essigmutter. (Journal für praktische Chemie, Jahrg. 1837, Zweiter Bd., p. 385.)

[2]) Turpin, Mémoire sur la cause et les effets de la fermentation alcoolique et acéteuse. Paris. Lu à l'Académie. 1838.

encore elles fournirent les modèles des appareils qui s'y rapportent. Elles nous ont appris que l'ébullition stérilise le moût de bière et que ce moût se conservera stérile, même quand nous l'aérerons, pourvu que nous purgions soigneusement ce même air de ses germes. En pratique on a effectué la purification de l'air, ici d'après la méthode Schwann, là par le procédé Schröder et Dusch: le procédé Schröder et Dusch surtout a reçu de grandes applications. Les flacons à tubes coudés employés par Schulze, Schwann, Schröder et Dusch ont fourni les modèles pour les divers matras de culture dont nous nous servons aujourd'hui dans les laboratoires bactériologiques et zymophysiologiques. Dans la plupart des cas, nous bouchons ces flacons à l'aide des filtres au coton de Schröder et Dusch. C'est surtout à M. Pasteur et à ses élèves que cette branche de la technique doit son développement ultérieur et son haut degré de perfection.

C'est dans Bail[1]) que nous trouvons la première allusion à ce que les ferments alcooliques, eux aussi, pouvaient être soupçonnés de causer des maladies, car, en 1857, il émet l'opinion que différentes sortes de levure suscitent souvent diverses fermentations. Il indique en outre la possibilité de l'importance pratique qu'on trouverait peut-être à cultiver systématiquement telle ou telle espèce. M. Bail ne fit cependant point d'expériences et se borna simplement à énoncer des suppositions.

Les ouvrages zymotechniques des années qui suivirent immédiatement 1857, témoignent aussi çà et là de l'opinion que, dans l'industrie de la fermentation, les levures tant haute que basse, se composent de différentes espèces ou races.

Nous voilà ainsi arrivés à l'époque où M. Pasteur fit son apparition, car, en 1857, il publia un mémoire sur la fermentation de l'acide lactique, et démontra que cette fermentation est due à un corps organisé, qui, d'après son opinion d'alors, se rapproche de la levure de bière.

En 1860, M. Pasteur publia les plus importants des résultats de ses nombreuses et profondes recherches sur la génération spontanée. Il poursuivit ces travaux pendant les années qui suivirent immédiatement 1860, et opposa beaucoup de force et d'habileté aux efforts faits de divers côtés pour prouver que la doctrine de Needham sur la génération spontanée était la véritable. En pareil cas, M. Pasteur pouvait toujours démontrer que, malgré l'exactitude de la méthode en principe, on avait commis telle ou telle faute dans les expériences

[1]) Th. Bail, Ueber Hefe (Flora 1857, nos 27 et 28, p. 438).

faites, p. ex. que l'air infecté n'avait pas toujours été complètement écarté, ou bien que le chauffage était resté insuffisant. Des choses qui ont l'apparence de menues bagatelles, peuvent précisément ici avoir beaucoup d'importance. L'idée soutenue par Spallanzani et ses adhérents, finit donc par triompher, grâce à la perspicacité et à la persévérance dont firent preuve les recherches de M. Pasteur.

Nous avons dit plus haut que, en 1837, Kützing publia quelques observations faites sur une bactérie de l'acide acétique découverte par lui. M. Pasteur a repris ces recherches et, le premier, leur a fait subir un remaniement expérimental intime [1]). Il a convenablement décrit et figuré la végétation bactérienne qui se produit dans les fabriques françaises de vinaigre et à laquelle il donna le nom de Mycoderma aceti. Ses essais ont fait constater avec certitude que c'est cette végétation qui cause la formation d'acide acétique. Il a également traité les côtés chimiques de la question. Cette recherche surtout est une des plus marquantes.

M. Pasteur concevait la susdite végétation bactérienne comme constituée par une seule espèce. En 1879, j'ai démontré qu'il y avait là-dedans deux espèces bien distinctes, et, donnant à l'une d'elles le nom de mon illustre prédécesseur, je la nommai Mycoderma Pasteurianum. M. Zopf et d'autres bactériologues ont plus tard changé ce nom générique en celui de Bacterium. Durant ces derniers temps, le nombre des espèces s'est encore augmenté, grâce à de nouvelles recherches faites soit par moi, soit par d'autres. Parmi ces bactéries de l'acide acétique, on en trouve plusieurs dont l'activité diffère carrément de celle des autres; il est donc vraisemblable qu'un jour on en arrivera aussi à introduire dans la fabrication du vinaigre une réforme analogue à celle que j'ai introduite avec succès dans les opérations de brasserie, savoir l'emploi de la culture pure d'une espèce choisie systématiquement. Jusqu'ici, toutefois, on n'a fait aucune démarche dans ce sens: on continue à travailler au hasard.

Les recherches de M. Pasteur et de ses prédécesseurs ont ainsi établi qu'il y a divers microorganismes capables de susciter différentes fermentations, l'alcoolique, la lactique, l'acétique, la butyrique, etc. Si donc on veut avoir une fermentation alcoolique pure, exempte de formations acides incommodes, il faut naturellement tenir à l'écart les microorganismes auxquels sont dues les autres sortes de fermentation

---

[1]) Pasteur, Mémoire sur la fermentation acétique. (Annales scientifiques de l'École normale supérieure, t. I. 1864). — Pasteur, Études sur le vinaigre. Paris, 1868.

que nous venons de nommer. Cette conclusion a été tirée par M. Pasteur, qui l'a appliquée en pratique au vin d'abord[1]).

De vieille date, on savait que ce liquide est exposé à diverses transformations gênantes qui pourraient à un haut degré le détériorer sous le rapport du goût et de l'aspect, le rendant p. ex. aigre, amer, glaireux, trouble, etc. Mais c'est M. Pasteur qui le premier en a découvert les causes, en démontrant que ces transformations défavorables, ces maladies, étaient dues à diverses bactéries. Comme remède à ce mal il recommanda l'emploi de la méthode de l'échauffement ci-dessus décrite et due à Scheele et à Appert. Il va de soi que ce traitement doit être entrepris à l'une des premières phases de la maladie, avant que les bactéries n'aient encore eu l'occasion de pulluler à un degré considérable: le vin a-t-il une fois commencé à se gâter, rien ne sert d'en tuer les ennemis.

L'opinion de M. Pasteur sur la fermentation alcoolique du vin est qu'en raison de la composition chimique du moût de vin, l'on peut sans danger abandonner le soin de cette transformation aux ferments qui se trouvent par hasard sur les raisins et dans l'air. Plus tard, il a répété cette opinion dans l'ouvrage cité ci-dessous, savoir „Études sur la bière“, p. 4.

Dans son livre sur les levures[2]) alcooliques, M. Reess décrit différentes espèces et en établit un système, en prenant pour point de départ l'idée que la forme et les dimensions des cellules présentent, en elles-mêmes, des caractères spécifiques. Il range donc sous le nom systématique de Saccharomyces cerevisiæ, les grandes cellules ovales, sous celui de Sacch. ellipsoideus les petites cellules ovales, sous celui de Sacch. Pastorianus celles en forme de boudin, et ainsi de suite. Comme on se le rappelle, mes recherches ont montré que cette conception est tout à fait incorrecte. Une seule et même espèce peut en effet se présenter avec des cellules pouvant se rattacher à toutes les espèces que M. Reess donne pour indépendantes. A la représentation d'espèces différentes se relie naturellement la représentation d'activités différentes; l'une et l'autre de ces idées sont aussi énoncées par M. Reess.

A la page 21, il fait remarquer comme possible que la méthode de changer de levure, telle qu'on la suivait alors dans toutes les brasseries, puisse être motivée par la contamination de la levure en contact avec les divers champignons qu'on rencontre dans de pareils locaux, et par les entraves que la croissance de ces champignons

---

[1]) Pasteur, Études sur le vin. Paris, 1866.

[2]) Reess, Botan. Untersuchungen über die Alkoholgährungspilze, 1870.

apportent à l'activité de la levure, au détriment de cette activité. A la page 40, il émet également l'hypothèse que, en compagnie de Sacch. cerevisiæ, il peut y avoir aussi des levures alcooliques, capables de susciter des fermentations préjudiciables.

L'année suivante (1871) vit paraître deux communications relatives à certaines maladies de bière, dont on attribua l'origine à des levures alcooliques; l'une est de M. Holzner, l'autre de M. Lintner père[1]). On y trouve décrite une maladie dangereuse qui ravagea alors les brasseries à fermentation basse. Cette maladie se révélait ainsi: la bière avait peine à devenir limpide dans les caves de garde, et quand elle y était parvenue, elle redevenait épaisse au soutirage, se remplissant alors d'une infinité de petites cellules de levure, que l'examen microscopique fit considérer comme pouvant rentrer dans l'espèce Sacch. exiguus, établie par M. Reess. Les susdits auteurs ne firent point d'expériences, et partirent alors de l'idée que les espèces décrites par M. Reess sont des grandeurs qui existent en réalité. Or, nous avons vu que tel n'est pas le cas; leurs recherches ne pouvaient donc pas fournir d'éclaircissements certains. Quant à mes recherches sur l'espèce en question, l'on voudra bien se reporter à ce qui suit.

On prétendit alors rencontrer la petite levure ci-dessus mentionnée, partout où la fabrication de la bière n'allait pas, et l'on se basa continuellement sur l'idée erronée qu'elle était une espèce bien déterminée, toujours reconnaissable par un simple examen microscopique. C'est aussi de cette manière que M. Engel prit la chose[2]). Le fameux brasseur Gruber, de Strasbourg, avait observé que sa bière prenait une singulière maladie après un séjour de 6—9 mois dans les caves de garde. Cette maladie consistait dans l'apparition d'une nouvelle fermentation qui opalisait la bière et lui donnait un reflet verdâtre. Cette fermentation arrêtée, la bière se clarifiait, mais elle avait alors entièrement perdu sa saveur primitive de bière fraîche et bonne et avait, par contre, un goût vineux. En examinant cette bière au microscope, M. Engel trouva de petites cellules de levure en grand nombre, et, suivant la coutume de son temps, il les rattacha sans plus de formalités au Sacch. exiguus, émettant en même temps la supposition qu'elles devaient être la cause de l'arrière-fermentation mentionnée. On allait vite en besogne alors; aussi les résultats obtenus s'en ressentirent-ils.

Une hypothèse contemporaine de la précédente, attribuait, mais aussi sans aucune preuve, aux diverses sortes de vin et de bière une espèce

[1]) Der Bayerische Bierbrauer. Munich, 1871, pp. 14 et 64.
[2]) Engel, Les ferments alcooliques. Paris, 1872, p. 30.

de levure sans doute propre à chacune d'elles. C'est ainsi que s'exprima, p. ex. M. Cohn dans son recueil intitulé „Beiträge zur Biologie der Pflanzen". Vol. I. 2e livrais., 1872, p. 136.

Tandis que, de bonne foi et sans faire de critique, M. Engel suivait les idées de M. Reess sur les espèces, il n'en était point ainsi de M. Cienkowski[1]). Ce dernier est d'avis que les espèces de Saccharomyces établies par M. Reess sont de simples formes du Mycoderma vini à diverses phases d'évolution. D'autres savants exprimèrent également une opinion qui concorda assez exactement avec la précédente. Si, adoptant cette idée modifiée, on pouvait dire qu'en général les levures elles-mêmes sont capables d'engendrer les maladies, il faudrait, en tout cas, changer totalement le point de vue choisi jusqu'ici.

C'est ainsi que la discussion de ces importantes questions s'agitait, sans qu'on se livrât à des expériences décisives: ce fut alors — en 1876 — que parut le célèbre ouvrage de M. Pasteur sur la bière et ses maladies[2]).

On se souvient que dans ses Études mentionnées plus haut, sur le vin, M. Pasteur avait prouvé que les bactéries sont la cause de toute une série de maladies de cette liqueur. Il démontra maintenant (pp. 4—7) qu'un fait analogue se passe quand il s'agit de bière. On doit en outre faire ressortir que ses expériences établirent complètement la rectitude de cette doctrine (pp. 20 et 26). C'est alors qu'il tira cette conclusion importante en pratique, que toute végétation bactérienne, capable d'attaquer le moût ou la bière, doit être regardée comme dangereuse pour l'exploitation entière, et qu'il faut employer tous les moyens pour tenir à l'écart les bactéries autant que possible. Il a indiqué plusieurs méthodes pour purifier la levure, mais, dans ce but, donné la préférence à la culture à l'aide du sucre de cannes dont la solution est additionnée d'acide tartrique à faible dose (p. 224). Ce fut, en tout cas, cette méthode qui fut préférablement recommandée par ces élèves.

A l'égard des levures, M. Pasteur a, dans plusieurs endroits de son ouvrage (voir surtout pp. 218—220), répété les opinions émises par ses prédécesseurs déjà cités, tels que MM. Reess, Engel, Holzner et Lintner, tandis que, dans d'autres passages (p. ex. p. 193) il semble au contraire montrer une tendance à se rallier à l'idée opposée, celle de MM. Cienkowski et Harz, savoir que les levures sont sujettes

---

[1]) Cienkowski, Die Pilze der Kahmhaut. (Bulletins de l'Académie de St-Pétersbourg, t. XVII, 1873.)

[2]) Pasteur, Études sur la bière. Paris, 1876.

à varier sans limites et rapidement, et qu'il n'y a aucune espèce fixe de Saccharomyces (et, par conséquent, pas non plus d'espèces de levure morbifique).

Ceci concorde également avec l'opinion qu'il émet p. 333, savoir que, dans les conditions ordinaires d'une brasserie, la levure basse de la bière peut se transformer en levure haute. En examinant de plus près (p. 199) un type spécial de levure, levure caséeuse, dont il a fait la découverte dans un levain de brasserie anglaise, il insinue la possibilité que ce type soit une des phases d'évolution de la levure de culture. Quand il parle des levures, il hésite encore partout; nulle part on ne voit de limites certaines.

En ce qui concerne la question du pléomorphisme, les idées de M. Pasteur ressemblaient essentiellement à celles de M. Bail, car il regardait les Saccharomycètes comme des formes évolutionnaires de certaines moisissures brunes (Dematium et Alternaria) qu'on trouve, p. ex. à la surface de divers fruits (pp. 154—155, 164—165, 177). Que M. Pasteur pût en arriver à se faire une idée aussi erronée, c'est facile à comprendre quand on songe qu'il ne fait aucune différence entre les Saccharomycès (levures où se forment des endospores) et les Non-Saccharomyces (levures exemptes de formation endosporique). Sur ce terrain-là, son exposé fourmille d'opinions contradictoires, et doit plutôt être considéré comme la discussion de diverses possibilités. Sur aucun point il n'a obtenu de décision scientifique. En général il ne nomme ses prédécesseurs que quand il veut justifier telle ou telle des erreurs de leurs travaux. Son ouvrage ne contient aucun exposé historique. Il n'y a non plus aucun passage où M. Pasteur ait manifesté l'intention de fournir un tel exposé, et c'est, par conséquent, une grande erreur de vouloir, comme on le fait souvent, en chercher un dans son ouvrage.

Le passage où il s'exprime le plus clairement sur les maladies de la bière engendrées par les levures alcooliques, se trouve p. 218. Il dit en cet endroit que dans certaines brasseries on fait pendant les mois d'hiver une sorte de bière basse de garde qui ne parvient pas aux consommateurs avant les mois d'août et septembre de l'année suivante, et qu'à l'égard de cette bière on craint fort que ce long séjour à l'entrepôt ne laisse prendre à la bière un goût vineux. „D'après mes observations, dit-il, ce goût vineux paraît dû principalement à un mélange, avec la levure de fabrication, du Saccharomyces Pastorianus ou de ses variétés“.

C'est donc avec beaucoup de précaution que M. Pasteur révèle son opinion: il n'exprime rien de positif. A l'hypothèse formulée par son prédécesseur, M. Engel, savoir que le Sacch. exiguus est la cause

de la maladie en question, il n'oppose, nous l'avons vu, qu'une nouvelle présomption, en disant que c'est, peut-être, une autre espèce. M. Pasteur ne tente pas plus que M. Engel d'extraire de la levure de brasserie le ou les microorganismes d'où vient la maladie, afin de produire plus tard une bière qui soit fermentée, dans un des cas, avec la bonne levure de bière seule, et, dans l'autre cas, avec cette même levure mêlée de la levure qu'on suppose morbifère. Et pourtant c'est la seule voie par laquelle nous pourrions arriver à voir clairement ce qui est levure morbifère, et ce qui est bonne levure de brasserie. La cause qui a retenu tant M. Pasteur que tel autre de ses prédécesseurs, de faire ces recherches décisives, est que les méthodes dont on disposait alors, ne le permettaient pas.

Une autre preuve de la confusion qui, en 1876, régnait dans les deux grandes questions de la culture pure de la levure de brasserie, et des maladies que les levures alcooliques suscitent dans la bière, c'est que M. Pasteur a pu recommander le procédé, ci-dessus mentionné, pour purifier la levure, savoir la culture dans une solution de saccharose légèrement additionnée de d'acide tartrique. Tant qu'il s'agit seulement de tenir en échec les bactéries, sa méthode est irréprochable, mais comme, en général, le levain de brasserie contient aussi des mélanges plus ou moins considérables de levures sauvages, le traitement par l'acide tartrique n'aura pas, dans la plupart des cas, et comme l'ont montré mes expériences, d'autre effet que de laisser supplanter la bonne levure de brasserie, tandis que l'évolution des différentes espèces de levure morbifère sera favorisée! (Voir mon mémoire intitulé „Qu'est-ce que la levure pure de M. Pasteur?" Comptes rendus du Laboratoire de Carlsberg, vol. III. 1re livrais. 1891). Mais pour juger convenablement le point de vue de M. Pasteur, il faut le voir éclairé par l'histoire de son temps: nous aurons peine à nous figurer qu'à cette époque on pût se rendre bien compte de cette question fondamentale. Comme nous le verrons plus tard, on n'en était pas plus avancé il y a une dizaine d'années. Une méthode comme celle indiquée par M. Pasteur, ne pouvait naturellement pas manquer de se montrer impraticable dans les brasseries. Aussi ceux qui l'essayèrent, l'abandonnèrent-ils promptement.

M. Pasteur fit fabriquer des récipients exprès pour la culture de la levure en question (pp. 326—340). En outre, il était d'avis qu'on fît disparaître des brasseries les bacs refroidissoirs et qu'on les remplaçât par des réservoirs fermés, dans lesquels le moût qui arrive de la chaudière à la température de l'ébullition, pourrait se refroidir et s'aérer sans subir aucun genre d'infection. A cet effet encore, il fit fabriquer un réservoir convenable (pp. 371—378). Peu de temps

après, M. Velten, collaborateur de M. Pasteur, adapta ces appareils aux conditions d'exploitation des brasseries. Quand, à cette occasion, durant ces dernières années, M. Velten s'est présenté, dans les gazettes de brasseries, comme l'inventeur de quelque chose de tout à fait nouveau, il aurait dû pourtant ne pas oublier que le principe de la stérilisation et les appareils qui s'y rapportent, avaient déjà été entièrement fournis par les devanciers de M. Pasteur; en outre, ce fut M. Pasteur, et non M. Velten, qui le premier en fit l'application technique au régime des brasseries. Ajoutons que, à plusieurs égards, la construction Velten n'était pas très heureuse.

Il va de soi que ces appareils doivent toute leur importance à la levure. Si cette dernière n'est point une culture réellement pure, exempte de tout germe morbifère, les appareils sont sans valeur. Or, comme on l'a vu, la levure Pasteur ne satisfaisait point à cette exigence. La conséquence fut donc que les appareils ne purent pas non plus être adoptés dans les brasseries.

Neuf ans après, ils furent réhabilités. On se rappelle qu'en 1883 j'ai réussi à introduire dans l'exploitation des brasseries l'emploi d'une levure de culture pure et provenant d'une race choisie systématiquement, et comme, l'année suivante, cette importante réforme avait été accomplie dans la brasserie du Vieux Carlsberg et ailleurs, le coup était porté au système des bacs refroidissoirs: ils furent peu à peu condamnés! L'appareil établi à Carlsberg à cette occasion, diffère à plusieurs égards de ceux que fit construire M. Velten, surtout en ce qui concerne la manière de stériliser l'air. A cet effet, M. Velten employait la méthode Schwann (surchauffage), tandis que dans l'appareil de Carlsberg l'air se purifie en traversant le filtre au coton dont il est parlé précédemment et qui est dû à MM. Schröder et Dusch. En effet, ce procédé s'est montré beaucoup plus pratique. (Dans la 5e livraison du IIe volume de ce journal (1888), j'ai rendu compte de recherches faites sur la purification de l'air à l'aide de filtres au coton et décrit l'appareil de culture pure que j'ai fait construire de concert avec M. le capitaine Kühle, directeur de brasserie).

Conjointement avec ma levure de culture pure, ces appareils se sont répandus sur une grande partie du globe durant ces dernières années. Comme on pouvait s'y attendre, on a dû commencer par la culture pure de races choisies systématiquement.

J'ai donc ainsi rendu compte de l'œuvre de M. Pasteur quant à la partie qui se rapporte directement aux questions à traiter dans le présent mémoire. Je ne me suis pas contenté de faire ressortir les progrès importants dus aux recherches de mon illustre prédécesseur; j'ai également indiqué les causes de leur impuissance à résoudre les

deux importants problèmes: celui des maladies de la bière et celui de la culture pure de la levure. Le procédé recommandé par M. Pasteur, paralysait la bonne levure de brasserie et favorisait les espèces de levure morbifères. En suivant la voie dans laquelle il était entré, il était tout à fait impossible d'atteindre le but.

Peu d'ouvrages ont fait sensation, dès leur première apparition, à l'égal de l'ouvrage de M. Nägeli sur les champignons inférieurs[1]). Aux pages 20—22, à propos de Saccharomycètes et de Bactéries, M. Nägeli exprime l'opinion que les espèces sont aptes à varier rapidement et considérablement, aussi bien dans le sens morphologique que dans le sens physiologique, et qu'un grand nombre en arrivent aisément à passer les uns dans les autres. En parlant de l'activité de la fermentation spéciale dont une espèce peut être douée, il pense aussi qu'elle disparaît bientôt sous l'effort de la culture et se transforme en une autre fonction toute différente. D'après M. Nägeli, les formes soit morphologiques, soit physiologiques se fondent facilement les unes dans les autres: rien n'est fixe. La composition chimique du milieu nourricier, ainsi que l'état de leur entourage, jouent le rôle de forces toutes-puissantes, créatrices, suscitant des transformations en différents sens. Quant aux preuves expérimentales des cas pris en particulier, il n'en donne pas.

Dans la „Zeitschrift für das ges. Brauwesen" 1876, 78, 80 et 81, on trouve des mémoires de MM. Lintner père et Holzner sur la question de la levure. Ils ont aujourd'hui abandonné leur ancien point de vue. Ainsi M. Lintner fait ressortir qu'une levure, qui se composait surtout de cellules petites et irrégulières („leichte Hefe") n'en donnait pas moins un bon résultat dans différentes brasseries; exemple frappant qui montre combien limité est le champ d'action de l'examen microscopique seul sur ce terrain-là!

Il remarque que la maladie que nous appelons trouble de la levure, gagne du terrain. „La bière, dit-il, est parfaitement claire, pendant qu'on la soutire de la tonne dans le local frais de la cave de garde; mais quand, plus tard, cette bière en bouteilles ou en fûts passe dans des lieux plus chauds, elle s'épaissit au bout de peu de temps. Dans la bière en cet état, l'on trouve de petites cellules de levure qui pullulent avec une grande rapidité et finissent par se déposer entièrement. Les brasseurs allemands appellent cette levure „Flughefe" en raison de sa faible densité."

---

[1]) Nägeli, Die niederen Pilze in ihren Beziehungen zu den Infectionskrankheiten und der Gesundheitspflege. Munich, 1877.

La cause de cette transformation peut, pense M. Lintner, être cherchée en partie dans l'influence qu'un mauvais malt est capable d'exercer sur l'évolution de la levure, en partie dans le fait que les brasseurs n'additionnent point leur moût d'une dose suffisante de levure et qu'ils mènent la fermentation à une trop basse température. M. Lintner admet qu'en pareille circonstance la levure normale de brasserie subit une transformation malencontreuse qui la dégénère, en sorte que cette levure en arrive à développer ces petites cellules légères dont on a parlé, et que c'est là l'origine de la maladie. Pour confirmer la rectitude de cette idée, il cite les spéculations théoriques de M. Nägeli.

On se souvient d'une opinion émise précédemment, savoir que la maladie ci-dessus décrite était engendrée par le Sacch. exiguus. Cette idée a été totalement abandonnée en 1881. La cause de la susdite maladie, ou des maladies analogues, dont la bière est atteinte, n'est plus cherchée dans les espèces de levure étrangères, ni dans un principe contaminant venant du dehors, mais dans les conditions d'entretien dans lesquelles se trouve la levure de brasserie même. La doctrine de MM. Reess et Pasteur avait laissé dans l'embarras les brasseurs, mais voici que M. Lintner, tout comme M. Holzner, leur montre une issue dans les théories physiologiques de M. Nägeli. La majorité des zymotechniciens de l'époque adoptèrent également cette tendance; à Berlin, MM. Delbrück et Hayduck en firent autant.

Les discussions sur la dégénérescence et la transformation de la levure de brasserie, arrivèrent donc alors au premier plan, et l'on pensa que la solution du problème des levures se trouverait par la voie de la chimie physiologique.

Les recherches de chimie physiologique auxquelles, comme nous l'avons dit, M. Nägeli a donné l'impulsion, n'ont pourtant répandu la clarté sur la question des levures dans aucun sens, ni sur ce qui concerne la question des dégénérescence et transformation de la levure de brasserie. Si l'on voulait être à même de traiter scientifiquement ce problème, il faudrait débuter par mes recherches botaniques.

Après que, en 1876, M. Pasteur eut abandonné ses études sur la bière et ses maladies, les années qui suivirent immédiatement, virent bien paraître quelques nouvelles recherches faites dans ce sens par ses élèves, mais aucune d'entre elles n'avait trait directement aux questions que nous allons traiter ici. L'état de la question, tel que l'école française l'y avait amenée en 1883, se trouve indiqué dans le manuel de M. Duclaux[1]; c'est pourquoi nous nous arrêterons un instant à

[1]) Duclaux, Chimie biologique. Paris, 1883.

cet ouvrage. A la page 300, M. Duclaux entame un chapitre sur la purification de la levure de brasserie, chapitre où il recommande le procédé Pasteur, dont nous avons parlé plus haut. L'impraticabilité de cette méthode, dont l'application favorise précisément, comme nous l'avons vu, l'évolution de quelques-uns des germes morbifères les plus dangereux, n'était donc pas encore reconnue à cette époque. Quant à l'examen de la levure de brasserie, M. Duclaux nous informe, p. 471, qu'à l'aide du microscope on peut décider si la levure est pure ou non. Aussi, en relisant attentivement ce passage, nous voyons que, d'accord avec lui-même, il ne voit dans les germes morbifères que les bactéries, et non les Saccharomycètes; il reproduit également cette manière de voir, p. 618, en traitant dans un chapitre à part, des maladies de la bière. C'est là tout à fait le même point de vue où se trouvait M. Pasteur sept ans auparavant. Aussi, dans les attaques dirigées contre moi par M. Duclaux et ses collaborateurs, ces messieurs partent-ils constamment de l'idée que M. Pasteur a frappé juste.

A cette époque, en Allemagne, la bactériologie s'anima d'une nouvelle vie par les recherches de M. Robert Koch et de ses élèves. Les problèmes dont s'occupa cette école, furent en général ceux qui avaient une importance directe pour l'art médical. Ce fut seulement par exception que, de ce côté-là, furent publiées des recherches zymophysiologiques. Parmi ces dernières, on doit donner place aux études de M. Hueppe sur les bactéries de l'acide lactique. Quant aux levures alcooliques, ni M. Koch ni ses élèves n'y firent attention; viennent-ils à en parler, c'est toujours d'une manière très fugitive. Il est aisé d'en comprendre le motif, si l'on se rappelle que ces microorganismes ont peu ou point d'intérêt pour le pathologue et l'hygiéniste.

Voici comment s'exprimait M. Thausing[1]) sur cette question, encore en 1884: „La science, il est vrai, nous a dotés de belles recherches sur les organismes de la fermentation et sur l'essence de ce phénomène, mais en fait de résultats directement applicables en pratique à la brasserie, le tout se réduit à rien, ou peu s'en faut; aujourd'hui, comme auparavant, ce qui se passe dans la fermentation est voilé de ténèbres mystérieuses pour le praticien. Il est vrai que les recherches de M. Hansen sur la culture pure de la levure nous donnent droit à de grandes espérances qui, si elles ne sont point déçues, nous mettront en face d'une conquête dont l'importance ne saurait être trop

[1]) Jul. Thausing, Einfluss der Hefegabe auf Hauptgährung, Hefe und Bier. Aus dem 14. Jahresberichte der ersten österr. Brauerschule in Mödling. De même dans l'Allgem. Zeitschr. für Bierbrauerei. Wien, 1884, p. 872.

hautement appréciée; mais, jusqu'à nouvel ordre, il nous faut encore compter avec l'état des choses telles qu'elles sont en réalité pour le moment". C'est là qu'on en était généralement en 1884.

Les travaux que j'ai publiés durant les années qui suivirent, et les résultats qu'ils m'ont fait obtenir dans la grande industrie de la fermentation, ont levé les doutes de M. Thausing. Dans la troisième édition de son fameux manuel de la fabrication de la bière, il a repris, d'une manière qui me fait honneur, mon système de culture pure de la levure.

Ceci nous amène à la fin de notre aperçu historique. Le chapitre suivant traitera des recherches que j'ai faites depuis 1881 sur les maladies de la bière.

## 3. Mes recherches.

### *Le problème et la méthode d'investigation.*

L'exposé historique précédent nous a fait voir comment, dans la question des rapports entre les levures alcooliques et les maladies de la bière, on s'était de proche en proche jeté sur une foule d'hypothèses. Chaque fois qu'on était sur le point de prendre la vraie route, on faisait subitement un nouvel écart et l'on cherchait, pour ainsi dire, les sentiers qui fourvoient.

Après l'apparition des œuvres de M. Nägeli, l'idée des dégénération et transformation de la levure de brasserie se mit au premier plan, comme nous l'avons vu. C'est là qu'on chercha la cause des maladies de la bière et des perturbations de l'exploitation, les attribuant à la levure. Cela détourna de plus en plus la pensée de l'autre hypothèse principale, savoir qu'on pourrait aussi chercher la cause dans l'intrusion d'espèces étrangères qui, dans leur concurrence avec les espèces de culture, auraient produit les phénomènes morbides. Comme on l'a dit, l'opinion prépondérante fut que l'exploitation même pouvait aisément devenir le théâtre de métamorphoses attaquant profondément la bonne levure de brasserie. De là tout ce qui s'est dit sur „la dégénérescence de la levure". Quant aux expériences, on ne s'y livra pas.

Dans ma thèse de doctorat, publiée en 1879, c'est foncièrement à ce point que je me trouvais, moi aussi. Toutefois l'étude de la question me fit bientôt reconnaître qu'il ne serait d'aucune utilité de poursuivre les discussions de mes devanciers sur les possibilités, mais que le cas exigeait des expériences péremptoires: tant qu'on n'en serait point arrivé là, il vaudrait mieux se taire. Plusieurs années se

passèrent en travaux préparatoires. Il me fallut d'abord élaborer une méthode de culture pure qui me permît de savoir avec une certitude parfaite si j'opérais avec une ou plusieurs espèces. Cela me fit choisir pour point de départ l'individu, la cellule unique. Je dus ensuite prendre à tâche de découvrir les caractères des végétations ainsi présentées, de résoudre les questions compliquées relatives aux espèce, race et variété. Avec le temps j'ai traité ces problèmes à divers points de vue. C'est dans la marche du développement des spores, surtout dans les températures maxima et minima, que j'ai trouvé les premiers caractères. Il est généralement reconnu que cette analyse a une grande importance dans le sens indiqué, et c'est là-dessus que j'ai pu ultérieurement baser une méthode commode pour l'examen pratique de la levure de brasserie. Ces raisons me font continuer à attacher une importance particulière aux caractères que nous fournit la marche du développement des spores; mais je n'ai jamais été de l'opinion que me prêtent souvent encore les lecteurs superficiels de mes ouvrages, savoir qu'à eux seuls ces caractères suffisent à déterminer toutes les espèces: au contraire, j'ai constamment dirigé mes travaux sur la découverte de nouveaux caractères distinctifs; j'en ai déjà fourni toute une série (représentation, au microscope, des végétations de la culture du moût; les voiles; les végétations sur un milieu nourricier solide; les rapports avec les espèces de sucre; germination des spores, etc.).

Les études théoriques auxquelles je viens de toucher, se trouvent dans mes „Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques".

En 1882 et 1883 se présentèrent deux occasions exceptionnellement favorables d'essayer mes nouvelles armes dans la pratique en grand. Je fais allusion aux maladies qui désolèrent alors les brasseries Tuborg et Vieux Carlsberg. Dans la première de ces brasseries, la bière fut atteinte d'un trouble de la levure; dans l'autre, au contraire, la maladie affectant la bière se révéla par une odeur désagréable et un mauvais goût d'amertume. Comme il était impossible de découvrir de défauts dans le moût ou dans la manière de conduire la fermentation, je dus présumer de préférence que des microorganismes étaient la cause. Des essais faits par la méthode Pasteur pour la purification de la levure, ne donnèrent pas d'amélioration. La confrontation de toutes les observations me mena à l'idée que la cause de la maladie devait sans doute être cherchée dans le levain même. Bien que l'examen microscopique ne m'eût pas permis de découvrir dans le levain d'autres organismes étrangers que quelques bactéries, je n'en partis pas moins de l'idée que les cellules de levure en apparence

identiques pouvaient bien appartenir à diverses espèces et que telles ou telles de ces dernières étaient la cause des maladies. Le procédé à suivre s'offrait de lui-même. Je dus décomposer en ses éléments la levure de brasserie, établir une nombreuse série de cultures pures de ces éléments, et terminer par des essais de fermentation, partiellement avec chaque espèce isolée et en partie avec des mélanges de ces espèces, en procédant, bien entendu, de manière à donner aux expériences l'allure du travail des brasseries. Si l'idée qui formait mon point de départ, était juste, je devais, en suivant cette voie, arriver à connaître celles de mes cultures pures qui contenaient une bonne levure de brasserie et celles contenant une levure morbifère. C'est une exploration de ce genre qu'on fait aujourd'hui assez facilement dans tout laboratoire de physiologie zymotechnique; mais à l'époque en question il y avait diverses difficultés à surmonter. Or, depuis ce temps, la technique s'est considérablement développée sur ce terrain.

Les expériences firent voir que les maladies en question sont dues à des espèces de levure qui diffèrent tout à fait des deux espèces de cultures surabondamment présentes dans le levain des deux brasseries, et dont chacune donnait séparément une bonne bière. Comme le montrent les sections suivantes de ce mémoire, il y a un assez grand nombre d'espèces dont l'influence peut causer des maladies analogues aux précitées. On peut dire de toutes ces espèces de levure morbifère que plusieurs caractères les distinguent nettement des espèces de levure de brasserie. Des expériences précises nous ont en outre appris que les espèces de levure morbifère trouvées dans l'exploitation, y viennent du dehors et ne sont point des phases évolutionnaires de la levure de brasserie.

Depuis que j'ai réussi à introduire dans les brasseries la culture pure, l'exploitation elle-même a fourni une bonne occasion de faire d'importantes observations en divers sens. Voici une longue série d'années que, dans les deux brasseries Vieux et Nouveau Carlsberg, j'étudie en grand cette culture de levure pure. On n'a jamais constaté aucun indice que les espèces de levure de brasserie puissent développer des types de levure analogues à ceux qu'on a cités comme cause de maladies; mais les levures de brasserie ont au contraire constamment conservé leurs caractères spécifiques dans l'état des choses en ces brasseries. Les théories des dégénérescence et transformation de la levure se sont donc montrées tout à fait fausses à cet égard.

Comme tous les organismes, les espèces de levure de brasserie sont tout naturellement sujettes à variations. Toutefois, tant qu'elles

sont exposées aux influences de la brasserie, elles ne subissent, comme je l'ai déjà indiqué, que de faibles variations, qui sont de nature passagère. Considérées au point de vue biologique, ces variations nous portent plutôt à les déclarer tout à fait insignifiantes, tandis que, aux yeux du brasseur praticien, la chose se présente d'une autre manière. En effet, ces transformations peuvent se manifester d'une manière désagréable et parfois causer une perturbation sensible. Durant le cours de l'année, elles forment une ondulation dans le flot de l'exploitation; quant à la cause propre, nous n'en avons pas même l'idée dans la plupart des cas. Ainsi la question de la variation des espèces de levure est non seulement d'une grande importance en théorie, mais ne l'est pas moins en pratique. Un aperçu des recherches expérimentales que j'avais faites dans ce sens antérieurement à 1890, se trouve dans le chapitre „Ueber die Variation“ de mes „Untersuchungen aus der Praxis der Gärungsindustrie“. I[er] fascicule. 2[e] édition. Munich, 1890. Ces études se poursuivent ici sans interruption dans mon laboratoire. Toutefois, il serait déplacé d'en faire plus ample mention dans ce mémoire qui doit traiter des maladies. Car nous ne saurions concevoir comme maladies les perturbations dues à la levure de brasserie même, au moins dans l'acception que nous avons donnée à ce mot et qui jusqu'ici a eu cours dans la bibliographie du sujet.

Les sections suivantes donnent une description de mes essais sur les maladies provoquées par les levures alcooliques, ainsi que de quelques recherches qui s'y relient. Dans les nombreux travaux requis pour les résultats, j'ai trouvé dans mes préparateurs, MM. Gram et Nielsen, une coopération très empressée.

### *Trouble de la levure occasionnée par les Saccharomyces ellipsoideus II et Sacch. Pastorianus III.*

Au début de mes études sur cette maladie, en 1882 et 1883, c'était l'une des plus redoutées, non seulement en Danemark, mais encore, et bien plus, en Allemagne. A cette époque il n'était point rare qu'elle causât de fortes pertes aux brasseries à fermentation basse. Comme nous l'avons appris plus haut, l'opinion régna pendant un certain temps que la cause de la maladie était une levure étrangère, le Sacch. exiguus, tandis que, plus tard, on entretint l'idée que le principe morbide gisait dans une dégénérescence de la levure de brasserie normale elle-même, le Sacch. cerevisiæ, qui, au lieu de développer de grandes cellules ayant le poids normal, n'en donnait que de petites et légères.

Dans la brasserie Tuborg près Copenhague, cette maladie se manifestait de la manière suivante: aussitôt après que, dans les caves

de garde à basse température, et à l'expiration du temps de cet entrepôt, la bière attaquée était tirée, elle était encore claire et, en apparence, exempte de défauts; mais lorsque, mise en tonneau et bouteille, elle y était restée exposée, pendant quelques jours, à une température excédant celle des caves de garde, p. ex., à la chaleur ordinaire des habitations, il se formait un précipité de levure plus ou moins abondant qui, par une agitation même assez légère du liquide, suffisait à troubler ce dernier. Quand la maladie était fortement développée, la bière qui s'en trouvait affectée, se chargeait si fortement, même au bout de deux à trois jours à dater du soutirage, qu'elle cessait complètement d'être potable.

Je pris de la bière malade dans la susdite brasserie, et j'en séparai les levures alcooliques qu'elle renfermait; de cette manière j'obtins trois espèces, dont une appartenant au groupe Sacch. cerevisiæ — l'élément principal de la levure basse de la brasserie de Tuborg — et deux espèces de levure sauvage, que j'ai mises en cours sous le nom de Sacch. Pastorianus III et Sacch. ellipsoideus II[1]). Ce que j'avais à faire ensuite, était de décider si la maladie était due à l'une de ces dernières espèces. La conclusion fut que l'une des trois espèces de levure de la bière malade, savoir le Sacch. cerevisiæ, donnait un produit stable quand il était seul présent dans le liquide en fermentation, tandis que la maladie se déclarait aussitôt que l'une des autres espèces, n'importe laquelle, se mêlait à la première dans les circonstances précitées.

En étendant mes recherches j'avais également recueilli le renseignement intéressant que les deux espèces morbifères ne provoquent pas la maladie, quand on les ajoute à la bière à la fin de la fermentation principale, c'est-à-dire au début de la mise en cave de garde.

Ces essais furent alors réitérés plus en grand. Les mêmes questions que ci-devant furent mises sur le tapis; en outre, je désirais obtenir des éclaircissements sur les quantités de levure morbifère qui doivent être présentes dans le levain pour que la maladie puisse se manifester, et finalement sur l'influence que doivent exercer une atté-

---

[1]) Une description de ces espèces et de celles dont il est parlé dans la suite, se trouve çà et là, dans mes „Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques". Le livre de M. Jörgensen intitulé „Die Mikroorganismen der Gärungsindustrie, 3te Ausgabe, Berlin, 1892" et le manuel de M. Zopf intitulé „Die Pilze", Breslau, 1890, les représentent collectivement sous une forme claire et palpable.

nuation plus ou moins forte pendant la fermentation principale, ainsi que la durée plus ou moins grande du séjour en cave de garde.

L'expérience nous apprit que la maladie peut se déclarer, même quand le Sacch. ellipsoideus II n'entre que pour $^1/_{41}$ dans le levain, mais seulement lorsque la bière est mise en cave de garde avec une quantité d'extrait égalant au moins 7,5 % Ball., et si en pareilles conditions le séjour en cave de garde est interrompu au bout de 2 mois $^1/_2$. Si, au contraire, la fermentation principale continue de façon que la quantité d'extrait se réduise à 6,7 %, et si le séjour de cette bière en cave de garde dure au moins 3 mois, la maladie ne se déclare pas.

Cette expérience fut répétée, mais je la modifiai en ajoutant au levain $^1/_{41}$ de Sacch. Pastorianus III au lieu de Sacch. ellipsoideus II. Le résultat principal fut le même; toutefois, aussi bien dans cette expérience que dans quelques autres, je constatai que la dernière de ces espèces de levure était la plus dangereuse des deux.

Enfin, je fis aussi des essais en grand pour connaître l'influence d'une infection dont le début coïncide avec la fin de la fermentation principale. Le résultat fut le même que dans les essais en petit du laboratoire.

Les expériences ci-dessus sont décrites dans mon mémoire précité (1883, Comptes-rendus du Laboratoire de Carlsberg). Je vais maintenant donner quelques communications sur les recherches que j'ai faites depuis lors sur la maladie présentement étudiée.

La première série de ces recherches fut commencée dans la cave de fermentation de la brasserie Vieux Carlsberg, la question étant de savoir si l'infection, au début de la fermentation principale aurait la même action dans les conditions de la brasserie que dans les expériences du laboratoire. La réponse fut affirmative.

Dans l'autre série des nouvelles expériences, la question fut ainsi posée: Qu'arrive-t-il à la bière quand elle n'entre en contact avec les deux espèces qu'après l'expiration du temps de garde, c'est-à-dire dans les tonneaux et bouteilles où on la met pour l'expédier aux consommateurs?

Dans ce cas encore, je constatai que le Sacch. ellipsoideus II était la plus vigoureuse des deux espèces de maladie. En outre, nous apprîmes que l'infection devenait plus active, quand elle se composait de cellules jeunes et fortes qui s'étaient produites dans le moût en quelques jours, que dans le cas de végétations datant d'une longue fermentation. Pour mettre le Sacch. Pastorianus III au niveau en pareilles conditions, il fallait en ajouter à la bière en

bouteille des quantités si fortes, que je ne puis m'imaginer comment, en pratique, ledit Sacch. Pastorianus III peut acquérir de l'influence à ce moment. L'autre espèce se comportait un peu différemment; car, quand la levure coulante employée à l'infection consistait en cellules jeunes et vigoureuses, il suffisait d'en ajouter une goutte à chaque bouteille pour provoquer l'épaississement de la bière au bout de 14 jours, tandis que, dans les bouteilles de contrôle, la bière se conservait environ trois semaines. Si l'on forçait l'infection, l'épaississement s'accélérait. Cette espèce peut donc en pratique susciter des perturbations, à ce moment aussi. Une forte aération de la bière, durant le soutirage, et un mauvais bouchage des bouteilles activent le développement des cellules sauvages. La bière faiblement fermentée et riche en extrait est aussi plus exposée qu'une autre à l'infection. Cela est également vrai de la bière au début et à l'expiration de son séjour en cave de garde. Le peu d'infection que la poussière de l'air peut entraîner au soutirage, ne saurait avoir aucune importance à cet égard. Quand une bière qui est bonne durant son séjour dans les tonneaux de garde, est attaquée par la maladie en question après le soutirage, la cause en est dans ce que les bouteilles et fûts de transport n'ont pas été convenablement nettoyés. Une légère infection de la bière de garde soutirée n'a aucune influence; même au cas du Sacch. ellipsoideus II, l'infection doit être relativement forte pour produire de l'effet.

Ces expériences et d'autres détails se trouvent décrits dans les éditions complètes de mon ouvrage.

Durant ces dernières années, l'une et l'autre desdites espèces ont aussi été observées par M. Lasche à Chicago et M. Kokosinski à Lille. Ces savants ont montré que, dans les bières des brasseries américaines et françaises, l'apparition de ces levures a lieu d'une manière aussi gênante que dans les brasseries danoises et allemandes.

### *Saccharomyces exiguus.*

En revenant à l'exposé historique précédent on se souvient pourquoi, durant les années qui suivirent la publication des recherches de M. Reess sur les levures alcooliques, on était porté à attribuer au Saccharomyces exiguus les perturbations qui peuvent se produire dans la fermentation quand la bière ne veut pas se clarifier, quand, au bout du temps de garde et après le soutirage, elle devient trouble ou prend un mauvais goût. Comme je l'ai dit, on ne fit aucune expérience, mais on se contenta d'un simple examen au microscope. Les

petites cellules de levure qu'on put trouver dans cette mauvaise bière, furent classées dans l'espèce de M. Reess, Sacch. exiguus. C'est ainsi que cette espèce fut, sans autre forme de procès, inculpée de toute une série de malheurs divers. Alors on ignorait que toute espèce de Saccharomyces peut développer des cellules qu'on peut classer dans la susdite espèce établie par M. Reess.

Si, dans l'état actuel de nos connaissances, on veut continuer l'emploi de cette dénomination systématique, il faut préférablement la relier à l'espèce que j'ai mentionnée dans mes „Recherches sur l'action des ferments alcooliques sur les diverses espèces de sucre“ (voir le IIe vol. de cette publication, 5e livraison, 1888). J'ai fait sur ladite espèce une série d'essais qui sont décrits dans les éditions complètes précitées de ma présente publication.

Le résultat principal fut que même une forte addition de Sacch. exiguus au début ou à la fin de la fermentation principale, ou à l'expiration du temps de garde, ne provoque dans la bière basse de garde aucune sorte de maladie. Les essais ayant eu lieu précisément dans les conditions réelles de l'exploitation, on peut aussi en inférer qu'en pratique les résultats sont parfaitement justes.

Il n'est pas possible de décider quelles ont été, à proprement parler, les cellules de levure qu'on a eues en vue à l'époque où le Sacch. exiguus jouait un si grand rôle dans les écrits de zymotechnie. Depuis qu'on a commencé à soumettre à un traitement expérimental les maladies provoquées dans la bière par les levures alcooliques, on n'a pas parlé de ladite espèce de levure. Naturellement il n'est pas impossible qu'un jour on découvre une espèce de levure morbifère à petites cellules, qu'un peu de bonne volonté fera rapporter à l'ancienne espèce Reess, savoir au Sacch. exiguus; mais, pour le moment, cet épouvantail a disparu du domaine de la zymotechnie.

Outre le Sacch. exiguus que je mentionne ici, il y a, comme je l'ai déjà fait ressortir en d'autres occasions, plusieurs autres espèces de levure sauvage qui, tout en étant capables de développer dans le moût une abondante végétation, ne peuvent pourtant pas provoquer de maladie dans la bière. Cela est également vrai de plusieurs bactéries.

*Odeur et goût désagréables donnés à la bière par le Sacch. Pastorianus I.*

Le résultat principal indiqué sous ce titre, fait l'objet d'une communication de quelques lignes que j'ai donnée, en 1884, dans la „Zeitscrift für das ges. Brauwesen“ avec promesse de faire ultérieurement plus ample mention de mes recherches. C'est cette dernière que va présenter ce qui suit, en y joignant de nouveaux essais.

Dans la communication provisoire que je viens de citer, je rapportais qu'en 1883 la bière du Vieux Carlsberg avait été attaquée d'une maladie consistant en ce que cette bière prenait un goût désagréable, amer, et sentait mauvais. Quelques connaisseurs en bière définissaient aussi ce goût et cette odeur comme analogues à ceux de la fumée; tous étaient d'accord que la bière était détériorée. En résolvant la levure en ses éléments je réussis à en isoler quatre espèces de Saccharomyces. Je soumis alors ces espèces à des expériences dans des ballons contenant du moût, et une seule d'entre elles donna une bière ayant bon goût et bonne odeur: c'est l'espèce que j'ai désignée sous le nom de levure basse Carlsberg n° 1 et qui, depuis ce temps, s'emploie sur une grande échelle dans les brasseries scandinaves. Parmi les autres se trouvait l'espèce que j'ai appelée Sacch. Pastorianus I. C'est seulement en présence de cette dernière dans le levain que la maladie parut. Si convaincants que puissent être ces essais faits en laboratoire, ils n'ont pourtant point la force probante de ceux qu'on fait dans la brasserie même, dans les conditions qui y règnent. Dans les éditions complètes de mon ouvrage sont décrites six séries d'expériences de ce genre.

L'odeur désagréable et le vilain goût amer communiqués à la bière basse de garde par la maladie dont traite cette section, se manifestait non seulement dans la bière toute prête, mais encore et déjà dans le moût en train de fermenter vers la fin de la fermentation principale. Les essais ont montré que cette maladie était due au Sacch. Pastorianus I et à la variété que j'ai produite de cette espèce de levure. A proprement parler, la maladie ne se produisait que quand l'infection avait lieu au début de la fermentation principale. C'est dans le levain et dans le moût des cuves de fermentation qu'on doit chercher les germes. Lorsque $^1/_5$ du levain consistait en Sacch. Pastorianus I, l'apparition de la maladie était bien accentuée; en diminuant la dose, je rendais la maladie moins marquée; on pouvait encore la découvrir, mais tout juste, quand cette espèce de levure ou sa variété formait $^1/_{22}$ du levain total. Dans les circonstances ci-dessus décrites, il semble qu'on ait ainsi atteint la limite. Une addition encore plus faible saurait donc à peine avoir une action fâcheuse dans le sens indiqué. Dans un essai où l'infection était forte, je constatai que la bière conservait, même après un temps de garde atteignant cinq mois, le mauvais goût et la mauvaise odeur qu'elle devait à cette infection.

Il était aisé de prévoir qu'une bière fermentée exclusivement à l'aide d'une culture pure de cette espèce ou de sa variété, devrait aussi contracter ces mêmes mauvais goût et odeur.

Si l'infection n'a lieu que dans les fûts de garde ou les tuyaux qui y conduisent, elle reste sans aucune action dans les conditions ordinaires de la brasserie. C'est ce qu'ont montré les essais faits en partie avec des végétations jeunes et vigoureuses, engendrées dans le moût par une culture d'un jour, et partiellement avec des végétations qui, de concert avec une espèce de levure de brasserie, avaient achevé une fermentation principale dans une cuve de fermentation de la brasserie. Dans un seul essai où la bière, au début de la mise en cave de garde, fut additionnée d'une dose extraordinairement forte d'une culture pure de Sacch. Pastorianus I, cette bière laissa un léger soupçon du goût désagréable et amer.

Une infection de la bière après l'expiration du temps de garde, fut, sous le rapport en question, aussi peu efficace que ci-dessus.

Toutefois ce n'est pas seulement sur le goût et l'odeur de la bière que le Sacch. Pastorianus I peut exercer une fâcheuse influence, mais il l'exerce aussi sur la stabilité de la bière. Dans les essais où le levain contenait le Sacch. Pastorianus I, ce dernier fut, en outre, cause que sur la fin de la fermentation principale la clarification était plus mauvaise qu'à l'ordinaire. Même à la proportion de $^1/_{22}$ dans le levain, la présence du Sacch. Pastorianus I avait pour effet que la bière à la fermentation de laquelle il contribuait, était de conserve notablement moins bonne, après le temps de garde normal, que la bière correspondante fermentée à l'aide d'une culture pure de levure de brasserie. De même que dans les essais ci-dessus décrits sur le Sacch. ellipsoideus II et le Sacch. Pastorianus III, l'atténuation de la bière et la durée du séjour en cave de garde jouent, ici aussi, un rôle important. Dans la première série d'essais, la bière fortement fermentée fut de conserve parfaite après avoir passé deux mois en cave de garde, bien que le levain contînt $^1/_5$ de Sacch. Pastorianus I. Quand l'atténuation durant la fermentation principale est assez forte, et qu'ensuite la bière ne fait pas un séjour trop court dans une bonne cave de garde, cette bière peut en général échapper aux atteintes du trouble de la levure après le soutirage. Si l'espèce de levure morbifère en question se trouve en plus grande quantité, ces précautions, comme nous l'avons vu plus haut, sont incapables de l'empêcher d'attaquer la bière autrement, c'est-à-dire en gâtant le goût et l'odeur.

Quant à l'action exercée par cette espèce de levure, j'ai d'ailleurs observé des oscillations analogues à celles que j'ai brièvement esquissées dans le chapitre sur le Sacch. Pastorianus III et le Sacch. ellipsoideus II.

Dans le cas où l'infection n'eut lieu qu'après que la bière eut quitté la cave de fermentation, par conséquent durant le temps de garde ou après son expiration, l'infection était sans influence sur la conservabilité de la bière, à moins d'y ajouter des quantités de levure morbifère relativement très fortes.

Si donc il se trouve un peu de levure morbifère dans les fûts de garde, les conduits qui les desservent ou les bouteilles et barils dans lesquels la bière est expédiée aux consommateurs, cela n'a aucune importance ni dans un sens ni dans l'autre: c'est au début de la fermentation principale que se trouve le danger. Il y a donc ici concordance avec les résultats principaux fournis par mes recherches, ci-devant communiquées, sur le Sacch. ellipsoideus II et le Sacch. Pastorianus III.

---

Les communications que j'ai publiées en 1883—1884 sur les levures morbifères, ont remis cette question à l'ordre du jour, et d'une autre manière que précédemment. Alors on commença à entreprendre dans la plupart des laboratoires zymotechniques des essais analogues à ceux que j'avais décrits dans les communications précitées. L'ère des expériences sur ce terrain était par là inaugurée.

Dans mes premières études je me bornais à rechercher quelle action avait une infection au début de la fermentation principale, et je laissais provisoirement hors de considération les autres phases de la fermentation. C'est la même méthode qu'ont suivie les auteurs qui plus tard se sont occupés d'études sur les relations des levures alcooliques avec les maladies de la bière. Un aperçu des résultats fournis par ces travaux ne sera point ici sans intérêt: c'est pourquoi communication en sera faite dans la suite.

En 1887, M. Grönlund publia une recherche approfondie sur des phénomènes morbides analogues à ceux que je viens de mentionner (Zeitschrift für das ges. Brauwesen). Il mandait que dans une brasserie danoise à fermentation basse, la bière, d'ailleurs de bonne conserve et de bon goût, s'était détériorée sous ce dernier rapport. Non seulement la bière était devenue amère, mais elle laissait un goût très désagréable, âcre et astringent. Dans cette bière malade il trouva une levure qui possédait tous les caractères avec lesquels j'ai présenté mon Sacch. Pastorianus I, et que, partant, il classa avec ce dernier. En outre, il prouva par des expériences directes que c'était là la cause de la maladie.

Les recherches faites plus tard par MM. Kokosinski à Lille et Lasche à Chicago, confirmèrent également l'exactitude de mes essais.

Ceci nous apprend que non seulement le Sacch. Pastorianus I est très répandu dans les brasseries, mais encore que cette espèce provoque ladite maladie redoutée, même dans des conditions aussi diverses que celles des brasseries des pays cités.

Dans les „Berichte der wissenschaftlichen Station für Brauerei in München pro 1885—88" et dans la „Zeitschrift für das ges. Brauwesen", 1891, M. Will communique une série de profondes recherches qu'il a faites sur deux nouvelles espèces de Saccharomyces. L'une de ces espèces était cause que la bière à fermentation basse prenait un goût particulier, douceâtre et un arrière-goût âpre et amer et que, durant l'arrière-fermentation, la clarification marchait plus lentement que quand la bière était exempte de ces cellules. L'action de l'autre espèce était essentiellement la même. L'une et l'autre appartiennent aux espèces dangereuses pour la fabrication de la bière à fermentation basse.

La station de brasserie de New-York, elle aussi, a récemment fourni, par l'entremise de M. Krieger, des communications sur des levures sauvages qui diminuent la stabilité de la bière, en même temps qu'elles lui donnent un vilain goût.

Dans la „Wochenschrift für Brauerei", 1889, M. Windisch décrit quelques essais de fermentation à l'aide de diverses espèces de levure de brasserie, et d'une espèce appartenant au groupe Sacch. Pastorianus, mais qui n'est pas décrite plus en détail. Ces essais furent faits dans des ballons avec du moût de bière stérilisé. La bière fermentée à l'aide de la dernière espèce citée de levure sauvage, ne parvint pas à devenir limpide et avait un goût désagréable, amer, ainsi qu'un déboire âcre.

Dans l'année 1891 du même journal, M. P. Lindner mande qu'il a observé une levure qui ressemble fort à une levure basse de brasserie. En voyant la fermentation, la clarification et la nature du dépôt de la levure, le brasseur praticien considérerait cette espèce comme une excellente levure basse, mais néanmoins elle produit une bière d'un affreux goût, amère et âcre. Cette dangereuse espèce de levure s'était glissée dans une des brasseries de Berlin et s'y était de proche en proche tellement répandue dans le levain que la bière commença bientôt à prendre le vilain goût en question. Ceci est un nouvel exemple, non seulement de la variété et du danger des espèces de levure morbifère, mais également du peu d'importance et du peu de sûreté des caractères d'après lesquels, auparavant exclusivement et, malheureusement,

encore sur une trop grande échelle, les brasseurs jugent de l'allure et de l'état de la fermentation.

M. Lasche aussi a observé de nouvelles espèces de levure de maladie. On peut s'attendre à les voir décrites dans le journal de la station de Chicago.

Les recherches précédentes se rapportent toutes à la bière à fermentation basse. Si toutefois on parcourt la littérature de la brasserie anglaise de ces dernières années, on y trouve plusieurs observations indiquant que les levures sauvages peuvent susciter d'aussi grandes perturbations dans les brasseries à fermentation haute que dans celles à fermentation basse. M. De Bavay, de Melbourne, a fait une recherche expérimentale par laquelle il montre que la maladie nommée par les Australiens „summer cloud" est due à un Saccharomyces (The Brewers Journal, London, 1889, p. 490.) La bière à fermentation haute, attaquée par cette levure sauvage, se trouble et prend un goût acidule et amer. Cette maladie est mentionnée comme un des plus grands fléaux pour les brasseurs de ce pays.

*D'où viennent les levures de maladie?*

Dans des recherches comme les présentes, notre tâche ne se borne pas à chercher quelle est la cause de la maladie, mais nous ajoutons aussi de nouvelles questions: A quoi pouvons-nous connaître les germes morbifères? Où ont-ils leurs foyers de production, et comment s'insinuent-ils dans l'exploitation?

Les caractères d'après lesquels on peut distinguer les espèces de levure morbifère d'entre les bonnes espèces de levure de brasserie, ont été élucidés par moi dans mes recherches théoriques ci-dessus mentionnées. Quant à l'importante question des foyers, nous ne pouvons malheureusement pas encore y répondre complètement. Je vais très brièvement communiquer ici ce qu'on en sait pour le moment.

En 1881, je publiai dans les Comptes rendus du Laboratoire de Carlsberg un mémoire sur le Saccharomyces apiculatus et sa circulation dans la nature. Mes recherches ont non seulement montré que cette levure se trouve en général sur les fruits juteux, doux et mûrs, mais encore fourni le renseignement plus important que ces fruits sont le giron nourricier normal de ladite levure. Au fur et à mesure de l'accroissement des fruits de jardin (ceux du genre indiqué), les générations de cellules de la levure pullulent et se trouvent aussi, de plus en plus abondamment, dans la poussière de l'air. Le Sacch. apiculatus se montre régulièrement d'abord sur les fruits juteux, doux et de maturité précoce, puis sur ceux qui mûrissent plus tard. Ainsi, dans le jardin de Carlsberg, le Sacch. apiculatus

ouvre la saison par les fraises, les groseilles à maquereau et les cerises pour la clore par les prunes et les raisins. La pluie et la chute des fruits l'amènent au sol. Durant les jours secs, il accompagne en l'air la poussière du terrain, et les cellules, déposées alors sur les susdits fruits, entrant en contact avec les sucs de ces derniers, peuvent produire de nouvelles générations par bourgeonnement. Tout cela peut se répéter plusieurs fois dans le cours de l'été, en sorte que le Sacch. apiculatus tantôt descend des fruits sur le sol et tantôt remonte à ses foyers d'entretien. Il hiverne dans la terre, et à l'été suivant renouvelle la même circulation. De lui-même il ne peut pas quitter son quartier d'hiver, et doit être aidé à en sortir. Durant les périodes de sécheresse, le vent le fait tourbillonner avec la poussière du sol; la pluie peut en éclabousser les plantes basses, telles que pieds de fraisiers; les insectes et autres petits animaux peuvent également jouer un rôle à cet égard. S'il arrive à un endroit qui lui offre l'aliment, il se met à pousser des bourgeons; autrement, il se dessèche et ne tarde pas à périr.

Dans un petit mémoire que j'ai publié en 1882 dans le „Tidsskrift for populære Fremstillinger af Naturvidenskaben", j'ai fait connaître le résultat des recherches que j'avais faites en attendant sur la part que les abeilles, guêpes et mouches prennent à la dissémination de cette petite levure. Je fis ressortir qu'à l'époque des fruits c'est surtout à l'aide des insectes qu'elle est transportée vivante à des points très distants des foyers primitifs de sa production. Quand ces insectes sont en contact avec les sucs dans lesquels des végétations de Sacch. apiculatus se sont développées, il arrive souvent que de grandes quantités de levure se collent aux villosités de leur corps et s'y dessèchent lentement. De cette manière, les cellules peuvent, comme l'ont montré mes essais, rester vivantes pendant plus longtemps que si la poussière de l'air les avait disséminées; car dans ce dernier cas la dessication est généralement plus forte.

Tels furent les résultats fournis par mes études précitées. Les fruits juteux et doux du jardin se sont montrés les foyers normaux de la propagation de la petite levure, et la terre est le lieu normal de son hivernage. Mes essais avaient donc montré que si, d'une part, les insectes et autres petits animaux concourent à répandre les cellules de cette espèce de levure, le vent joue aussi, à cet égard, un rôle très important. C'est surtout ce dernier moyen de transport qui a droit à l'attention des brasseries, quand il est question de microorganismes.[1]).

[1]) J'ai publié de nouvelles recherches sur le Sacch. apiculatus dans le „Botanisches Centralblatt", vol. XXI, nº 6, 1885; dans les „Annales des

Le Sacch. apiculatus est encore aujourd'hui la seule espèce de levure dont la circulation dans la nature soit connue. Mes tentatives pour jeter le jour sur cette question en ce qui concerne les Saccharomycètes proprement dits (cellules de levure avec formation d'endospores, celle-ci faisant défaut dans le Sacch. apiculatus, comme on s'en souvient) n'ont pas encore mené au but. Nos connaissances des espèces les plus importantes pour l'industrie de la fermentation est, à cet égard, défectueuse.

Les premiers savants qui aient étudié les cellules de levure, ont déjà observé qu'elles se trouvent sur les fruits juteux et doux, surtout sur ceux qui sont tarés, et qu'elles s'y multiplient. Mes nombreuses recherches ont également montré que ceci est général, et que surtout les fruits tombés fournissent auxdites cellules de nombreux foyers d'entretien.

En parlant des levures du vin, M. Pasteur émet l'idée qu'elles n'hivernent pas en terre. C'est pourtant là-contre que vont mes recherches. En effet, j'ai trouvé ces levures à l'état de vie, dans le sol, sous les ceps, dans plusieurs endroits en Allemagne, aussi bien durant les mois de printemps que dans ceux de l'été, c'est-à-dire à une époque où il ne se trouvait pas encore de raisins mûrs. Il est très vraisemblable que les levures observées par moi, ont été portées dans le sol durant l'automne précédent, lorsque les raisins étaient mûrs et que les graines tarées fomentaient d'interminables générations de pareilles cellules de levures. Mais, garantir que les choses se passent ainsi, c'est ce que ces recherches ne sauraient. Toutefois j'ai prouvé, par des expériences directes, que des cellules de diverses espèces de Saccharomyces que j'avais enfouies dans la terre au mois de septembre, étaient encore vivantes au bout d'un an, par conséquent d'une saison de fruits à la suivante. Les premiers essais que j'ai faits dans ce sens, sont décrits dans le résumé français des Comptes rendus du Laboratoire de Carlsberg, 1882, p. 203; mes essais ultérieurs se trouvent dans les mémoires précités. Parmi ces espèces de Saccharomyces, il y a aussi une levure du vin que j'ai décrite, en 1883, sous le nom de Sacch. ellipsoideus I, et l'espèce de levure morbifère précitée, dite Sacch. Pastorianus I.

Il est donc certain qu'au moins quelques espèces de Saccharomyces peuvent hiverner en terre[1]), et certain

---

sciences naturelles, Botanique". Tom. XI, no 3, 1890, et dans les „Annales de micrographie". 1890.

[1]) Dans une communication sur l'hivernage des levures du vin (1890), M. Müller-Thurgau se range à l'opinion que j'ai émise. Cependant

également que les fruits juteux et doux leur offrent un milieu nourricier favorable. Mais, le sol est-il leur seul refuge normal durant l'hiver et le printemps, et les susdits fruits sont-ils les foyers normaux de leur production? Nous l'ignorons; car les observations dont on dispose, ne nous autorisent point à tirer d'emblée cette conclusion. Pour cela, en effet, il faudrait des preuves expérimentales analogues à celles qu'ont fournies mes recherches sur la circulation du Sacch. apiculatus; mais, comme je l'ai dit, c'est ce que je n'ai pas encore réussi à donner. Au point qu'ont atteint les recherches, nous devons encore constamment convenir qu'il y a une chance pour que les vrais Saccharomycètes puissent avoir, dans la nature, des foyers de propagation et des lieux d'hivernage autres que les susdits, et peut-être plus importants. Ici encore, nous retrouvons l'ancienne question de savoir si les Saccharomycètes sont des organismes indépendants ou de simples formes évolutionnaires des champignons supérieurs. Si ce dernier cas était le vrai, il est naturel que nous devrions alors prendre en considération ces premiers parents; et même il serait bien possible que ces derniers fussent précisément de la plus haute valeur pour l'intelligence du problème. A ce point de vue, ces recherches purement théoriques présentent aussi un intérêt pratique. Malgré les efforts les plus énergiques des plus fameux savants pour trouver ces parents présumés, on n'en a pas découvert trace jusqu'à présent. Dans ces derniers temps, c'est surtout M. Brefeld qui, comme on le sait, a rappelé l'attention sur cette question. Pour le moment, le résultat est que nous devons continuer à compter avec les Saccharomycètes comme avec des organismes indépendants.

Des recherches ci-dessus il résulte qu'en toutes saisons la poussière de l'air peut contenir des cellules de vrais Saccharomycètes, et parmi elles des espèces de levure morbifère. C'est le sol des jardins fruitiers qui, à cet égard, présente le grand danger. La procréation de nouvelles générations de cellules a lieu en libre nature à l'époque où, comme nous l'avons dit, les fruits juteux et doux des jardins sont mûrs, c'est-à-dire surtout durant les mois d'août et septembre en Danemark. Durant ces mois-là donc, la poussière contient non seulement le plus grand nombre de ces cellules, mais encore un nombre relativement moindre d'individus affaiblis, comparativement aux autres saisons. Les nuages de poussière

il a, sur un point, mal compris mes mémoires, comme le prouve ce qui précède; car son point de départ est qu'à mon sens la dissémination des cellules de levure a lieu exclusivement à l'aide du vent.

qui, durant ces mois, s'élèvent du sol en tourbillonnant dans les jardins fruitiers, contiennent souvent une riche récolte de cellules jeunes et vigoureuses.

Mes analyses précitées des microorganismes de l'air ont montré qu'en 1879 les Saccharomycètes avaient, peu à peu, rempli de plus en plus la poussière de l'air durant le laps de juin à août, en sorte que l'infection produite par elles atteignit son maximum à la fin de ce dernier mois. Sur quoi, nouvelle baisse. En 1878 et 1880, cette infection fut la plus intense en août et septembre, de sorte que le maximum tomba au commencement de ce dernier mois. Dans les autres saisons, ces cellules furent très rares. Août et septembre sont, en matière d'infection par les cellules des levures sauvages, les deux mois les plus dangereux pour les brasseries.

Les bacs refroidisseurs ouverts sont la voie par laquelle, en général, les cellules pénètrent dans l'exploitation, mais parfois aussi elles peuvent forcer directement l'entrée de la cave de fermentation. Il est plus rare qu'elles aient accès à la bière dans les tonneaux de garde; mais nous avons vu que, même si cela arrive, l'état normal neutralise leur importance; en tout cas, cela est vrai des espèces que j'ai examinées.

Tant que le moût des bacs refroidisseurs conservera sa température la plus élevée, les cellules de levure seront ou tuées ou, en tout cas, entravées dans leur développement. C'est seulement quand la température baisse qu'elles peuvent commencer à bourgeonner. Le moût aéré et refroidi passant des bacs aux cuves de fermentation, des cellules de levure vivantes peuvent se fixer aux conduits et s'y propager dans la mince couche liquide qui y reste. C'est de cette manière que peuvent se former des foyers entiers d'infection. La prochaine livraison de moût sera donc plus fortement infectée que la précédente. On voit par là combien il est important de nettoyer souvent et à fond les conduits et leurs joints; il va de soi que la même règle concerne les bacs et les trubsacs. Quant aux dangers que ces derniers peuvent entraîner avec eux, M. Will a donné, sur ce point, de précieux renseignements dans la „Zeitschrift für das ges. Brauwesen", 1892. Il est d'une importance particulière d'ajouter le levain au moût dans les cuves de fermentation aussi tôt que possible, afin que ce levain puisse immédiatement commencer à lutter contre ces intrus dangereux.

Toutefois, ce n'est pas seulement la poussière des jardins fruitiers qui peut introduire dans les brasseries les espèces de levure morbifère: une autre source d'infection est dans la lie des fûts de

garde. Même dans les brasseries dont l'exploitation est bien conduite, cette lie contient presque toujours de plus ou moins fortes doses de levure sauvage; si la brasserie a été ravagée par des espèces de levure morbifère, la lie est alors particulièrement dangereuse. Auparavant, dans presque toutes les brasseries, on prenait la chose avec beaucoup d'indifférence. La lie se répandait dans la cour; sur quoi une partie de cette lie était emportée, par la chaussure des gens, directement dans la cave de fermentation. Une grande partie fut desséchée et réduite en poussière, et, dans cet état, transportée par le vent dans les bacs refroidisseurs et dans la cave de fermentation. Il y a quelques années, j'ai appelé d'une manière pressante l'attention des brasseurs sur ce danger. Aussi montre-t-on bien aujourd'hui plus de prudence qu'auparavant à cet égard, mais il n'est pourtant pas superflu de rafraîchir la mémoire à ce sujet.

La manière dont une brasserie s'inocule sans doute le plus fréquemment la levure morbifère, est cependant l'emprunt de levain à une autre brasserie. Il s'y relie toujours un danger plus ou moins grand. C'est pourquoi les brasseries d'importance ont aujourd'hui adopté dans leur exploitation le système de culture pure.

### *Mélanges d'espèces de levure de brasserie.*

Dans les cas examinés, j'ai constaté que le levain donnait une bière de moins bonne conserve, lorsqu'il consistait en un mélange de deux espèces de levure de brasserie que quand il était formé exclusivement de l'une de ces espèces, n'importe laquelle. Dans ces mélanges, l'espèce qui figurait pour la moindre part, jouait le rôle de levure morbifère. Les expériences nous ont appris que ceci arrivait non seulement lorsque le rapport entre les deux espèces du mélange était celui de 9 à 1, mais encore pour la proportion 19 à 1, c'est-à-dire quand l'espèce de levure de brasserie étrangère n'entrait que pour $^1/_{20}$ dans le levain. Nous voilà en présence du cas singulier où de bonnes espèces de levure de brasserie changent, pour ainsi dire, de nature, de sorte qu'elles en arrivent à agir comme espèces de levure de maladie.

En nous rappelant que la levure basse Carlsberg n° 2 appartient aux espèces qui ne donnent pas une bière de notablement bonne stabilité, nous ne trouverons rien de réellement frappant à ce qu'une addition de cette espèce à un levain composé de levure basse Carlsberg n° 1 rendît la bière moins conservable que quand cette dernière espèce de levure fournissait, à elle seule, la fermentation.

Ce qu'il y a au contraire de remarquable, c'est que la levure basse Carlsberg n° 1, qui se distingue précisément par la propriété

de donner une bière de bonne stabilité, ajoutée à un levain formé de l'autre des susdites espèces de levure, ait pu faire rendre la bière fermentée par ce mélange des deux levures, moins bonne à conserver que si la fermentation eût été opérée par la levure basse Carlsberg n° 2 seule.

Le phénomène ci-dessus décrit ne se produit que si le séjour de la bière en cave de garde est interrompu assez prématurément, savoir au bout de $1^1/_4$ ou $1^2/_3$ mois: après une garde de 3 mois l'on en pouvait découvrir tout au plus une faible trace. En tout cas, cependant, un séjour de $1^1/_4$ mois donnait une bière limpide, et, quand la levure n° 2 y prédominait, cette bière était de telle nature qu'on devait en considérer le temps de garde comme expiré.

Dans les brasseries où l'on opère avec des espèces de levure telles que cette dernière, et où, par conséquent, le temps de garde est court, des mélanges tels que les susdits peuvent susciter des perturbations.

Ces recherches fournissent une nouvelle preuve de la nécessité d'opérer dans les brasseries avec une culture pure d'une seule espèce ou race systématiquement choisie.

*Mycoderma cerevisiæ.*

Le résultat principal de mes recherches est que parmi les espèces formant des membranes et que nous désignons en général sous le nom ancien et systématique de Mycoderma cerevisiæ, il se trouve au moins une espèce qu'on doit classer parmi celles qui sont incapables de nuire à la fabrication de la bière. Cette espèce apparaît par grandes masses dans les caves de garde des brasseries de Copenhague, et c'est d'elle qu'il s'agit dans mes recherches.

Les maladies du Mycoderma dont les stations zymotechniques de Prague et de Chicago viennent de faire mention, sont dues à des espèces tout à fait différentes de la mienne. En tout cas, cela est vrai de celles qu'a examinées M. Lasche.

*Juillet 1892.*

---

VII.

## Sur l'extension actuelle de mon système de culture pure de la levure.

### 1. But de cet aperçu.

Dans mes mémoires précédents que reproduisent ce volume-ci et le 2e volume des Comptes rendus du Laboratoire de Carlsberg, j'ai donné un ample exposé des méthodes que j'ai élaborées pour les

culture pure, analyse et traitement de la levure, tant à la brasserie qu'au laboratoire. Je suppose ici que ces travaux sont connus.

Toute recherche qui tend à changer profondément une opinion ancienne et enracinée, rencontre une résistance qui devient deux fois plus vive quand la question dont il s'agit, présente un intérêt non seulement théorique, mais encore pratique. Toutefois, il n'est rien qui soit plus capable de faire progresser une pareille affaire que des résultats pratiques favorables. Le savant qui désire susciter une réforme sur le terrain de la vie réelle, ne doit pas dédaigner d'opérer en praticien: c'est précisément là qu'on doit gagner les batailles. Les preuves et développements théoriques ne sont que de faible secours. Mais il va de soi que son travail doit s'appuyer sur une base scientifique.

En 1888, je donnai un aperçu de l'extension que mon système avait prise alors: j'y mis particulièrement en relief les brasseries qui avaient introduit dans leur exploitation l'appareil de culture pure. Ces communications firent leur effet, surtout à cause des adresses exactes qu'elles contenaient. Les praticiens purent alors se rendre aux fabriques en renom, désignées, y constater par eux-mêmes les résultats qu'on avait obtenus et contrôler ainsi la rectitude de mes indications. Dans le nouvel aperçu que je présente au public dans ce qui suit, j'ai suivi le même procédé, c'est-à-dire que j'ai de nouveau attaché l'importance principale à désigner les fabriques où s'emploie l'appareil de culture pure. Au point de l'extension que mon système a atteint aujourd'hui, il serait d'ailleurs prolixe de nommer tous les établissements qui ont adopté dans leur exploitation la culture pure; car la plupart emploient à cet effet mon ancien procédé (propagation des cultures pures dans de petites cuves de fermentation ayant la forme ordinaire).

Un grand nombre des laboratoires qui s'occupent à produire la levure pure pour l'usage des praticiens, emploient également à cet effet l'appareil de culture pure. Toutefois, comme d'après mon plan la liste que je vais donner ne comporte que les fabriques, je passerai ici sous silence les laboratoires.

Dans la liste de 1888, on ne trouve que des adresses de brasseries à fermentation basse; dans la liste présente, leur nombre s'est considérablement augmenté, preuve palpable des progrès que le nouveau système a faits durant ces quatre dernières années. Ceci appert encore de ce qu'il s'est frayé accès aussi aux brasseries à fermentation haute, aux distilleries d'alcool et fabriques de levure pour la boulangerie, ainsi qu'à la fermentation du vin de raisin et de fruit, bref, à toutes les ramifications de la grande industrie où s'emploie la fermentation alcoolique.

L'aperçu ci-joint donne aux praticiens qui se retranchent encore dans le doute relativement à mes tentatives de réforme et les éconduisent, une plus grande facilité que précédemment pour s'enquérir personnellement et pratiquement de ce qu'elles produisent. Comme je n'ai pris aucun brevet et qu'en aucune façon je ne tire de mes travaux un avantage pécuniaire, le but de cet aperçu ne saurait être mal compris[1]).

**2. Brasseries à fermentation basse.**

Dans les éditions complètes, précitées, de mes recherches actuelles, on voit que les appareils à cultures pures sont employés dans des brasseries à fermentation basse, dont les nombres sont respectivement comme suit: en Danemark 7, Norvège 4, Suède 5, Allemagne 65, Autriche 3, France 2, Hollande 4, Suisse 1, Finlande 1, Russie 11, Pologne 1, Espagne 1, Amérique du Nord 10, Amérique du Sud 13, Asie 2, Australie 1.

---

Parmi les brasseries qui ont aujourd'hui adopté mon système dans leur exploitation, il n'y en a qu'un petit nombre qui emploient à cet effet l'appareil précité; la plupart opèrent encore, comme on l'a dit plus haut, suivant mon ancien procédé, c'est-à-dire que, pour la première multiplication de la levure, elles emploient de petites cuves à fermentation ordinaires. Le nombre de ces brasseries s'élève à plusieurs centaines; elles sont situées dans tous les pays où l'on emploie la fermentation basse.

La Bohême occupe une position spéciale. Comme on le sait, l'industrie du brasseur est parvenue, dans ce pays, à un développement éminent. Pourtant, la Bohême fut de ceux où la culture de la levure pure ne fut introduite que tard, savoir, longtemps après que cette méthode avait été approuvée dans d'autres pays. Il est vrai que dans les premiers temps le Professeur, Dr Belohoubek se fit l'avocat de la nouvelle réforme, et simultanément invita avec insistance à fonder à Prague une station d'essai pour brasserie: mais ce plan dut se réaliser avant que ladite réforme fît des progrès en Bohême, grâce

[1]) A l'occasion des renseignements qu'on ne cesse de me demander, je me permets d'appeler de nouveau l'attention sur ce que le laboratoire placé sous ma direction est simplement un établissement de recherches scientifiques et que, par conséquent, il ne peut se charger de faire des analyses, de préparer des cultures pures et, en somme, d'exécuter des travaux pour MM. les industriels.

surtout aux efforts du Directeur Kukla. Ce qu'il y a ici de remarquable, c'est que toutes les brasseries de Bohême qui emploient mon système, sont de petites usines. L'appareil de culture pure n'est introduit nulle part, et autant que j'ai pu me renseigner, en somme, aucune des grandes brasseries n'a introduit dans l'exploitation la culture pure. La situation en Bohême diffère donc à cet égard de ce qui a eu lieu dans tous les autres pays. Ce serait trop nous écarter de notre sujet principal que de vouloir rechercher la cause de cet état particulier des choses.

Avant de clore cette section, il ne sera pas sans intérêt de jeter un coup d'œil sur l'Amérique du Nord. C'est là que, durant ces dernières années, le système de culture pure a fait le plus de progrès. Ma liste montre que mon système est adopté dans les brasseries les plus grandes et les plus renommées. Dans leur Revue, MM. les Docteurs Wahl et Henius rapportent qu'aujourd'hui la culture pure est introduite, avec le meilleur résultat, dans plus de 50 brasseries de l'Amérique du Nord.

Dans cette partie du monde les choses vont en général plus en grand qu'en Europe. C'est ainsi que, parmi les brasseries désignées dans ma liste, celle de M. Pabst à Milwaukee produit annuellement env. 750000 barrels (env. 900000 hectolitres); celle de M. Jos. Schlitz à Milwaukee env. 600000 barrels (env. 700000 hectolitres) et celle de M. Anheuser Busch à Saint-Louis env. 542000 barrels (env. 630000 hectolitres). Pour comparaison l'on peut communiquer ici que la production annuelle du Vieux Carlsberg est de 290000 hectolitres. En somme, nous voyons que c'est d'une gigantesque industrie que nous nous occupons ici et que les comptes s'y font, non pas par milliers, mais par millions.

### 3. Brasseries à fermentation haute.

D'après ma liste, le nombre de brasseries à fermentation haute où l'on emploie l'appareil de culture pure, s'élève à 3 en Danemark, 2 en Allemagne, 5 en France, 2 en Hollande, 5 en Belgique et 1 en Finlande. En 1884, après avoir établi la culture pure dans quelques brasseries à fermentation basse de Danemark et d'Allemagne, j'invitai M. le Directeur Alfred Jörgensen à faire des essais analogues dans les brasseries danoises à fermentation haute. On constata alors qu'en pareil cas il fallait choisir entre les races de levure de faible fermentation et de prompte clarification. A cette même époque, M. Jörgensen avait introduit une levure haute de culture pure dans la brasserie de M. Baartz, dite Oranjeboom, à Rotterdam. En 1890, M. Grimmer, directeur technicien en chef en donna communication, d'où il résulta

que cette dernière levure avait donné de bons résultats. Dans l' „Œsterreich. Brauer- und Hopfen Zeitung" 1892, nº 15, il rapporte que cette fameuse brasserie emploie aujourd'hui 3 appareils qui tiennent systématiquement en activité la culture pure. M. Arminius Bau a également introduit avec succès la culture pure dans des brasseries de Hollande à fermentation haute. De même, le laboratoire Jörgensen a, durant ces dernières années, procuré à un grand nombre d'autres brasseries étrangères à fermentation haute, des races de levure provenant de culture pure et méthodiquement choisies.

M. le Dr Olsen a introduit dans la brasserie Ringnes & Cie à Christiania une levure haute de culture pure.

Ce progrès se propagea de bonne heure jusqu'en Australie. Dans „The Australian Brewer's Journal" (Melbourne, 20 décembre 1888 et 20 janvier 1889) MM. Mac Cartie et De Bavay rapportent que le procédé en question a donné de bons résultats dans plusieurs des brasseries australiennes à fermentation haute et cela, non seulement pour les bières légères (running ales), mais encore pour les bières fortes (stock beers). Ils font ressortir qu'on n'a pas eu de difficultés à obtenir une arrière-fermentation convenable, et qu'à Melbourne on brasse des bières qui ressemblent essentiellement à celles d'Angleterre.

Dans les brasseries à fermentation haute du Nord de la France, la culture pure est aujourd'hui en bonne activité, grâce à son inaugurateur, le Dr Kokosinski, directeur de la station de brasserie à Lille. Dans son mémoire sur l'„Application industrielle de la méthode Hansen à la fermentation haute" (Station scientifique de brasserie. Comptes rendus. Gand. 1890, p. 13), il rapporte qu'il a commencé ses essais dans ce sens, en 1888, dans une brasserie de Lille, et que, deux ans après, le système était introduit dans 15 brasseries à fermentation haute du Nord de la France.

En 1889, M. le Dr J. Vuylsteke, professeur à l'Université de Louvain, fit des essais analogues dans quelques brasseries belges, et en obtint aussi un résultat particulièrement favorable. Presque à la même époque, M. le Dr van Laer, professeur à la station de brasserie de Gand, s'était mis aussi à opérer dans le même sens. En 1891, il fonda la „Société des Ferments purs", et donna par là une puissante impulsion à la forte extension du nouveau système dans les brasseries à fermentation haute de Belgique, de Hollande et de la France septentrionale. Dans cette société, la levure se fabrique dans les deux brasseries désignées dans ma liste, savoir celle de M. Caulier à Bruxelles et de M. Spreux à Tournai.

En Belgique la fabrication de la levure par culture pure et le commerce de ce produit se rattachent donc à deux brasseries, tandis

que dans les autres pays ce sont les laboratoires de zymotechnie qui s'en sont emparés. Toutefois la station de Berlin se distingue des autres laboratoires en ce qu'elle s'est elle-même construit une brasserie, et y a établi un département pour la fabrication de la levure par culture pure, essentiellement à l'instar de la „Société des Ferments purs" de Belgique.

Ce qu'il y a de frappant, c'est que le système de culture pure n'ait presque pas encore pu se faire jour en Angleterre, pays dans lequel la fermentation haute a prévalu de vieille date, et où l'on trouve les plus grandes brasseries du monde.

Lorsque, en 1889, je fis à Londres ma conférence „On my system of pure yeast culture and its application in top fermentation breweries" (voir „Transactions of the Laboratory Club"), cette affaire avait bien éveillé en Angleterre un vif intérêt, mais on préférait la discussion aux expériences. Dans ses „Cantor Lectures", M. Gordon Salamon avait donné un aperçu de mes recherches et recommandé aux brasseurs anglais de faire des essais d'après le procédé que j'indiquais; mais son invitation ne trouva que peu d'adhérents. Autant que je sache, MM. H. T. Brown et Morris étaient à cette époque les seuls qui eussent fait les susdits essais, savoir dans la brasserie de Worthington à Burton-sur-Trent. Ces essais ne donnèrent, à vrai dire, aucun résultat décisif, mais les chimistes susdits n'en furent pas moins de l'opinion que la nouvelle réforme finirait aussi par se frayer une entrée dans la brasserie anglaise, comme elle l'avait fait ailleurs. Sans doute, la plupart des zymotechniciens anglais pensaient alors qu'on pouvait employer la culture pure de la levure à fabriquer les bières légères (running beers, running ales), mais en niaient l'application aux bières fortes (stock beers) qu'on soumet à une arrière-fermentation. On s'était fait l'idée que cette arrière-fermentation dépendait de ce que le séjour en cave de garde convertissait en maltose, puis laissait fermenter la maltodextrine et autres sortes de dextrine inattaquables à la fermentation principale. Pour que cette arrière-fermentation pût se produire, on admettait en outre la présence de certaines espèces sauvages de levure basse. On ne fournit pas de preuves expérimentales qui justifiassent cette théorie, mais, en revanche, elle fut l'objet de nombreuses et amples discussions dans diverses revues.

On doit se rappeler que feu le capitaine J.-C. Jacobsen du Vieux Carlsberg avait une idée analogue relativement à la bière de fermentation basse; car il admettait que les espèces de levure sauvage que j'excluais, moi, étaient précisément ce qu'exige la production de l'arrière-fermentation. Il prétendait s'appuyer sur quelques passages des œuvres de MM. Reess et Pasteur, qu'on peut aussi entendre de

cette manière. Cette opinion était erronée, comme le prouvaient mes essais directs.

Ma conférence de Londres, mentionnée ci-dessus, renvoie à ces essais. Les résultats favorables sus-décrits, obtenus dans des brasseries australiennes où l'on opérait essentiellement d'après les méthodes anglaises, parlaient également contre les objections élevées en Angleterre. Comme on y paraissait disposé à faire des essais avec un mélange de plusieurs espèces de levure, je décrivis comment on pouvait faire ces essais. Lui aussi, ce procédé réclame naturellement la culture pure, si l'on veut avoir la certitude. Toutefois, comme il pourrait causer de grands embarras aux brasseurs, je les dissuadai d'en faire l'application, et les incitai au contraire à poursuivre les essais avec des races de levure séparées et systématiquement choisies, en suivant mes méthodes.

Les brasseries anglaises à fermentation haute ont, pour adopter le nouveau système, les mêmes motifs que les autres branches de l'industrie zymotechnique. Les fermentations des brasseries anglaises sont, tout comme celles d'autres brasseries, exposées aux attaques des bactéries et levures sauvages capables de provoquer des maladies dans la bière et de causer, par là, grande perturbation et forte perte pécuniaire. Dans le levain des brasseries anglaises on trouve également en général, non point une, mais plusieurs espèces de culture: il n'y a aucune certitude que l'espèce favorable y prédomine; pas même la certitude de sa présence. Tout se passe ici au hasard; en réalité, le brasseur ne sait point du tout quelle levure il met dans ses cuves de fermentation.

Un grand nombre des vieilles brasseries anglaises que j'ai eu l'occasion de visiter, avaient un local mal agencé pour la fermentation, et les conditions d'emplacement rendaient impossible d'entreprendre un changement à cet égard. Les chambres de fermentation étaient, tout comme les bacs refroidisseurs, fort exposées à la poussière: tout courant d'air apportait avec lui l'infection. C'est précisément en pareilles circonstances qu'il y a motif spécial pour employer, dans l'exploitation et par grandes masses, la levure de culture pure, provenant de la bonne race. C'est ainsi que l'on contrecarre le plus énergiquement et les bactéries et les levures sauvages. Si l'on ne peut ou qu'on ne veuille pas introduire en entier la culture pure, au moins on se munit par ce procédé de la faculté de donner la prédominance à l'espèce voulue de levure.

Après ma visite, quelques brasseries ont commencé à faire des essais, et l'on a vu paraître en public de nouveaux avocats de mon système, notamment MM. Hagen-Schow et le D[r] Sykes. Durant

ces deux dernières années, plusieurs brasseries de diverses localités d'Angleterre ont reçu des envois réguliers d'espèces de levure haute de culture pure, provenant du laboratoire Jörgensen à Copenhague. J'en conclus qu'elles doivent avoir obtenu des résultats satisfaisants; autrement c'est à peine si elles auraient continué à y dépenser leur argent. M. Frank Wilson, directeur de la brasserie de la Castle Street, Long Acre à Londres, m'a récemment informé que lui et son fils avaient réussi à introduire une race de levure provenant de culture pure, qui lui a donné un bon résultat. Finalement je puis, avant de terminer, annoncer que durant l'été dernier on a fondé, à Burton-sur-Trent, une société dite „The British Pure Yeast Company". Le technicien en chef de cette société est le même pour la susdite société de Bruxelles, savoir M. le Professeur, Dr van Laer. L'exploitation y sera conduite comme dans les établissements belges sus-décrits qui font la culture pure, et le but est de fournir aux brasseries de la Grande-Bretagne une levure de culture pure. Les journaux de brasserie anglais rapportent que la race de levure isolée par M. van Laer, a été essayée dans quelques-unes des plus importantes brasseries à fermentation haute, et l'on y a fait ressortir que cette race a donné l'arrière-fermentation désirée et une bière d'excellente qualité. Il semble donc aujourd'hui que le nouveau progrès doive dans un avenir prochain s'affermir dans le grand royaume insulaire, où la vieille méthode de fermentation haute s'est maintenue à travers les siècles.

**4. Distilleries et fabriques de levure pour la boulangerie.**

Comme il arrive, on le sait, qu'une même usine produit à la fois des alcools et de la levure, et que cette même usine tient pour produit principal tantôt l'une, tantôt l'autre de ces denrées, je n'ai point entrepris de démarcation entre les distilleries et les fabriques de levure.

Comme le montre ma liste, il y a pour le moment 7 fabriques où l'on opère avec l'appareil à culture pure; elles se trouvent en Danemark, Allemagne, France, Russie, dans l'Amérique du Sud et en Asie.

Ce n'est que durant ces dernières années que dans ces fabrications an a adopté le nouveau système.

Dans la „Zeitschrift f. Spiritusindustrie", 1892, nº 6, et „Ergänzungsheft", p. 24, M. le Professeur, Dr Delbrück renvoie au résultat favorable obtenu en brasserie, et le prend pour point de départ. Dans les numéros suivants de cette même Revue, on voit que la station de Berlin vient de réussir à introduire dans plusieurs distilleries allemandes une race de levure due à une culture pure. On a ainsi obtenu un plus fort rendement en alcool qu'auparavant.

Je dépasserais beaucoup les limites du travail présent, si je cherchais à rectifier les erreurs relatives à la question des levures et qui se sont enracinées dans ces usines. Cependant, avant de clore cette section, je mettrai en relief un point unique, parce qu'il a une importance spéciale pour le mouvement qui vient de se produire. C'est la même erreur que j'ai eu à combattre, quand je commençai mes tentatives de réforme en brasserie. On exige de la culture pure plus qu'elle ne peut fournir par sa nature. A-t-on une levure ordinaire, plus ou moins impure, qui dans telle usine donne un bon résultat, la culture pure qu'on retire de cette levure, ne servira généralement point à augmenter le rendement. Or, si l'on arguë de cela pour rejeter cette levure de culture pure, on fait une faute. L'importance de la levure de culture pure consiste dans la certitude qu'elle donne. Si la race de levure est bien choisie, elle fournit le résultat le plus favorable, et continuera de le faire, tant que les circonstances de la culture resteront à peu près les mêmes. En employant la levure impure, ordinaire, on n'a au contraire aucune certitude: au bout de peu de temps sa composition peut s'être altérée à tel point que cette levure donne un résultat tout autre que satisfaisant; bref, employer une levure impure, c'est opérer constamment en aveugle et, de fait, on ignore complètement quelle substance on ajoute au liquide nourricier des cuves de fermentation. Dans l'état actuel des choses, c'est la fermentation qui est la source de la plupart des oscillations subies par l'exploitation, et des plus dangereuses. En introduisant une race de levure cultivée à l'état de pureté, et méthodiquement choisie, l'on opère avec certitude à cet égard, et l'exploitation devient rationnelle. C'est là qu'est le progrès. Mais on trouve encore dans les usines plusieurs autres sources d'oscillations et de dangers, dont il ne faut pas jeter la faute sur la levure pure. Comme, dans ce qui précède, j'ai dû le mettre fortement en relief, la levure pure ne peut pas tout faire. Les exigences relatives à la bonne qualité des matières premières et à l'application intelligente et précise du procédé, restent les mêmes qu'auparavant.

Enfin, je puis également citer ici qu'à Copenhague M. Schiöttz-Christensen a produit une levure de culture pure comme succédané du levain acide employé à la panification du seigle.

**5. Fermentation du vin de raisin et du vin de fruit.**

Par ses recherches sur la fermentation du vin, M. Pasteur est arrivé à l'opinion qu'on peut sans danger abandonner le moût de raisin à la fermentation spontanée causée par les levures qui se

trouvent à la surface des graines. Dans ses „Études sur la bière", p. 4, il répète cette expression. De fait, on continua aussi à laisser tranquillement au hasard le soin de conduire la fermentation; jusqu'à nouvel ordre il n'y avait personne qui songeât à trouver un procédé plus rationnel. A cette époque on prenait également pour point de départ que le Saccharomyces ellipsoideus ou, comme M. Pasteur l'appelait, „la levure ordinaire du vin", est une espèce déterminée. En 1883, je montrai qu'au moins deux espèces se cachent sous ce nom. Les recherches que, cinq ans plus tard, je publiai sur l'action des levures alcooliques sur les diverses espèces de sucre, ont en outre fait ressortir que, dans le sol, sous les ceps de vigne et ailleurs, on trouve des cellules de levure qui ressemblent aux cellules habituellement désignées sous le nom systématique de Sacch. ellipsoideus, mais qui s'en distinguent par leur manque de spores. Plusieurs de ces non-Saccharomycètes provoquent une vive fermentation dans les solutions de dextrose, et pour cette raison il n'est peut-être point invraisemblable qu'elles contribuent souvent à la fermentation du vin. Sans doute, on les a aussi décrites comme appartenant au Sacch. ellipsoideus. Tout cela montre que la levure du vin n'est pas une, mais plusieurs espèces.

Quand mon système de culture pure eut commencé à gagner du terrain dans le monde de la brasserie, l'attention se porta également sur la fermention du vin. Comme je l'ai dit, on avait jusqu'alors abandonné partout le précieux moût de raisin à la fermentation au hasard.

Le premier qui alors soumit cette question à un traitement scientifique, fut le Français Louis Marx (Moniteur scientifique. Paris. 1888). A l'aide des méthodes indiquées par moi pour la production de cultures pures et pour l'analyse des espèces de levure, il démontra que, dans chaque levure du vin, l'on trouve au microscope plusieurs espèces qui souvent se confondent à l'œil, mais qui néanmoins sont différentes à plus d'un égard, et qui, dans le moût de raisin, exercent aussi leur activité de diverses manières. De même que dans les espèces de Saccharomyces examinées par moi, l'on constata, ici aussi, que la marche du développement des spores donne de bons caractères.

En pratique on trouva particulièrement importants les essais faits par M. Marx sur un seul et même moût à l'aide de plusieurs des espèces qu'il avait isolées. Il ensemença à part avec chaque espèce, et constata alors qu'elles pouvaient produire des vins de bouquets différents et de goûts différents. C'est pourquoi il émit l'opinion que l'emploi d'une culture pure d'une espèce de levure déterminée et choisie, mettrait à même de produire un vin meilleur que par un

autre moyen, même quand le moût est moins bon. Ce sont là, en substance, des résultats pareils à ceux qu'ont fournis, dans le domaine de la brasserie, mes essais avec les levures basses Carlsberg n° 1 et n° 2 durant les années 1883 et 1884. Il donne une méthode pour produire en grand de la levure de culture pure, et pouvoir ainsi s'assurer aisément une bonne fermentation du moût de raisin.

A peu près en même temps que M. Marx, un autre Français, M. Rommier, publia, dans les „Comptes rendus de l'Académie de Paris", quelques communications sur la fermentation du vin. Toutefois il n'opérait point avec des cultures pures, et toutes les fois qu'il n'employait pas la levure telle qu'elle s'était développée dans son vin, il se servait de méthodes analogues à celles qu'en 1876 M. Pasteur dans ses „Études sur la bière" avait proposées pour purifier la levure de brasserie. M. Rommier prend la chose comme si, depuis la publication de l'ouvrage cité de M. Pasteur, ces recherches étaient restées stationnaires, et il semble ne point connaître les progrès faits hors de France durant cet intervalle.

Dans ses expressions M. Rommier part de l'idée que le bouquet du vin se détermine uniquement par la levure, et qu'un moût provenant de terroirs qui ne produisent que des vins ordinaires, donnera au vin les mêmes caractères principaux que tel ou tel vin fin servant de type, pourvu qu'on y emploie une levure provenant du vin fin. Ce sont les mêmes observations que M. Marx, lui aussi, avait communiquées; mais ici on les présente comme valables dans tous les cas. Quant au moût, sa composition chimique est regardée comme insignifiante: c'est la levure qui doit tout faire. Plusieurs zymotechniciens avancèrent, comme M. Rommier, de pareilles assertions hasardées.

Comme il est mentionné plus haut, j'avais en 1883—1884 montré pour la première fois, par des expériences exactes, qu'il se trouve différentes espèces de Saccharomyces donnant des produits fermentés de nature différente. Tout en insistant dans mes études de brasserie pour qu'on fît attention à l'importance d'effectuer la fermentation à l'aide d'une espèce ou race unique méthodiquement choisie, je fis en même temps ressortir que le cachet de la bière et sa nature entière sont déterminés par plusieurs facteurs autres que la levure; cette dernière constitue bien un facteur très important, mais ce n'en est qu'un seul. C'est une grande lacune dans les communications écrites, durant ces dernières années, sur la fermentation du vin, que les auteurs se soient contentés d'étudier superficiellement les recherches connues, faites sur la fermentation de la bière; car ce sont pourtant ces recherches qui constituent la base, et c'est sur ce terrain qu'ont été faits les plus grands progrès.

En 1890, deux autres Français, MM. Martinand et Rietsch se sont présentés avec des recherches qui se rattachent étroitement à celles de M. Marx déjà mentionnées. Ils ont produit les cultures pures de la même manière que ce dernier savant. Ils ont fondé à Marseille un établissement pour fournir, aux gens de la pratique, des levures de vin pures et provenant de races choisies. En 1891, M. Jacquemin a, de concert avec M. Marx, fondé, au Locle, un établissement semblable.

Le premier pas pour obtenir qu'en Allemagne on pratiquât la fermentation du vin d'une manière plus rationnelle, fut fait par M. le Professeur, Dr Müller-Thurgau. Durant l'automne de 1890, il fit les premiers essais à l'aide d'une levure de culture pure, savoir une espèce qui avait été isolée du vin de „Steinberg". Dans une lettre qu'il eut la bonté de m'envoyer en décembre 1891, il s'exprime de la manière suivante: „Stimulé par vos écrits, j'ai commencé à faire en Allemagne de vastes essais sur la fermentation pure du vin et, conséquemment à ces essais, j'ai mis en activité des fermentations de vin, dans la pratique, sur une grande échelle, et à l'aide d'une race de levure provenant de culture pure et choisie à cet effet. Bien que des raisons techniques nous aient empêchés jusqu'ici d'employer de véritables fermentations pures, les résultats sont cependant tout à fait importants." C'est-à-dire qu'on ajoutait des cultures pures au moût de raisin ordinaire.

Une exposition claire de l'importance que la culture pure de la levure a pour la fermentation du vin, a été donnée par M. le Professeur, Dr Wortmann dans un mémoire paru, en 1892, dans le „Weinbau und Weinhandel" no 23. En outre, il a lui-même fait des expériences relatives à cette question dans la station d'essai de Geisenheim.

En Italie, ce sont surtout MM. les Drs Forti et Pichi dont les travaux dans ce sens ont réussi.

Il nous faut maintenant voir comment les choses se passent dans la fabrication du vin de fruit. En 1890, le Français, M. Kayser a donné une communication de quelques essais qu'il avait faits avec du moût de pomme. A cet effet il employait sept espèces de levure, tant séparées que mélangées, et arrangeait ses essais de façon à les rapprocher autant que possible de l'état réel des choses. Les espèces de levure étaient isolées de divers vins de fruit français (cidres). On constatait que quelques-uns d'entre eux donnaient un bon produit, d'autres non, et qu'en employant un levain composé d'une seule espèce, on pouvait obtenir un bon cidre.

Cependant, le premier qui, sur ce terrain, ait fait des essais en pratique, c'est M. le Dr Nathan, de Rottweil. Sa communication à ce sujet a paru dans le journal „Der Obstbau", Stuttgard,

1891—1892. Ces essais ont amené le résultat que la bonté du vin de fruit et son cachet sont plus fortement déterminés par l'espèce de levure qui joue le rôle principal dans la fermentation, que par le moût. M. Nathan réussit à purger partiellement de germes le moût qu'il employait à ses essais, et pour cela il le fit passer par une essoreuse du type Bergh. Le résultat fut si favorable que M. le conseiller intime de la Chambre de commerce Duttenhofer, propriétaire de l'établissement où se préparent les vins de fruit sous la direction de M. le Dr Nathan, a engagé ce dernier à introduire dans l'exploitation entière le système de la culture pure de la levure. Pour faciliter la fabrication des vins de fruit en Wurtemberg, M. Duttenhofer a également veillé à ce qu'en son établissement les gens de la pratique puissent s'approvisionner de bonnes races de levure à l'état de culture pure. „La culture pure de la levure, dit M. Nathan, va susciter toute une révolution dans la fabrication des vins de fruit et en fera une industrie florissante."

### 6. Coup d'œil rétrospectif.

Durant les neuf années qui viennent de s'écouler depuis que j'ai fait, à la brasserie Vieux Carlsberg, mes premiers essais en pratique, mon système de culture pure de la levure a pris une grande extension, comme nous le montre ce qui précède. Il est aujourd'hui adopté dans toutes les branches de la grande industrie où l'on pratique la culture des levures alcooliques, et il a gagné des adhérents dans tous les pays. Plusieurs de mes anciens adversaires s'en sont faits les puissants défenseurs. Quelle différence entre maintenant et l'époque du début!

M. le Professeur Aubry, de Munich, l'un des zymotechniciens qui entrèrent les premiers en lice pour défendre mes tentatives de réforme, en dit ce qui suit, dans une communication datée de 1891: „En 1884, ce n'était point une tâche légère que d'être l'avocat d'une cause qui non seulement fit hausser les épaules aux autorités de la science zymotechnique, mais encore contre laquelle quelques-unes de ces autorités faisaient ouvertement et énergiquement la guerre, de telle façon que les brasseurs se méfiaient et se tenaient à l'écart. On alla même jusqu'à employer comme tactique d'attribuer à la culture pure les insuccès survenus dans l'exploitation, insuccès qu'un homme du métier aurait regardés comme insignifiants ou comme l'effet d'autres causes. En pareilles circonstances la conviction que la brasserie ferait de grands progrès dans la nouvelle voie, fut ma seule source d'encouragement à continuer de défendre la bonne cause, et c'est seulement par une grande lutte qu'elle a fini par réussir".

Tandis que M. Aubry fait remarquer mes luttes, M. Alfred Jörgensen, dans la 3e édition de son livre intitulé „Die Mikroorganismen der Gärungsindustrie“ appelle au contraire l'attention sur l'approbation que mes travaux obtinrent peu à peu dans le domaine littéraire. En réalité, il y a eu fluctuation jusqu'au dernier moment, tantôt pour, tantôt contre, et pourtant progrès continuel. Au début, la résistance fut grande; mais des collègues éminents m'aidèrent à en triompher. J'ai eu ailleurs l'occasion d'exprimer ma sincère reconnaissance à ce sujet, et je renouvelle ici mes remerciements.

D'après le progrès aujourd'hui réalisé par le système de culture pure de la levure, c'est à peine si l'on pourrait taxer de hardiesse mon opinion qu'au bout d'un âge d'homme on sera tellement avancé qu'on ne pourra comprendre les difficultés qui me barraient le passage quand je frayai le chemin. C'est alors que l'ensemble se présentera comme une chose toute naturelle, ainsi que cela a eu lieu dans le cours des siècles pour la culture des plantes d'ordre supérieur dans le jardinage et l'agriculture. En réalité, c'est bien aussi le même principe; il n'y a de différent que les méthodes, la partie technique. La science, encore jeune, des microorganismes est une phase de la science biologique plus ancienne des organismes supérieurs. Plus d'un des problèmes de microbiologie que nous ne faisons qu'entamer aujourd'hui, a déjà été depuis longtemps approfondi dans l'étude des plantes supérieures.

Parmi les fabrications auxquelles sert la fermentation alcoolique, celle de la bière basse présente les plus simples conditions en ce qui concerne la fermentation: on y trouve plus de facilité qu'ailleurs pour maîtriser cette fermentation. Il s'ensuit naturellement que la culture pure d'espèces ou races systématiquement choisies a dû aussi être introduite dans cette fabrication avant de l'être dans d'autres. Il en naquit en outre une occasion d'introduire des appareils à purifier l'air, refroidir et aérer le moût stérilisé et bouillant sans le mettre en contact avec l'air impur. Non seulement c'est dans les brasseries à fermentation basse qu'on a commencé la culture pure de la levure, mais c'est également là qu'on a poussé la perfection plus loin que sur tout autre terrain. L'expérience qu'on y a acquise, en est ainsi arrivée à constituer la base des essais faits en ce sens dans les autres branches de l'industrie de la fermentation.

La fabrication de la bière basse est si proche parente de la fabrication de la bière haute, que les modifications à faire au nouveau système pour qu'il passât de l'une à l'autre de ces fabrications, se sont rapidement réalisées. Les petits changements dont il fut ici question, surtout relativement à la construction de l'appareil de propagation,

furent effectués par MM. Jörgensen, Kokosinski, Jensen et van Laer.

La distillerie et la fabrication de levure pour la boulangerie sont, comme celle des vins de raisin et de fruit, les branches de l'industrie de la fermentation qui par leur nature devaient être les dernières à prendre la nouvelle voie. Ici le mode d'opération est très différent de celui qu'on emploie dans les brasseries à fermentation basse; ici aussi, les liquides employés sont généralement infectés à un plus haut degré que le moût des brasseries, même de celles qui emploient les bacs refroidisseurs ouverts. Et pourtant, l'expérience montre ici encore qu'une culture pure et vigoureuse d'une bonne race de levure triomphera, dans la plupart des cas, des concurrents en présence d'elle et, par conséquent, donnera aussi, en pareilles circonstances, une fermentation suffisamment pure et de la qualité désirée. Comme je l'ai dit plus haut, des essais pour stériliser le moût ont été commencés par M. Marx pour la fermentation du vin de raisin, et par M. Nathan pour celle des vins de fruit.

L'étude des levures alcooliques a influé sur d'autres branches industrielles que les susdites, bien qu'indirectement. Dans une conférence faite par M. le Professeur, D[r] Weigmann, à l'inauguration de la station d'essais de laiterie à Kiel („Der Zweck und die Aufgaben der bakteriologischen Abtheilung der milchwirtschaftlichen Versuchsstation in Kiel". Beilage zur Milch-Zeitung 1889, n° 40), il renvoie aux résultats pratiques fournis à la brasserie par le système de culture pure de la levure, et il désigne comme une tâche pour l'exploitation de laiterie, de chercher à atteindre un but semblable dans les points où a lieu une fermentation. Il s'agit ici surtout des questions de l'acidification de la crème, des défauts du beurre et du lait, et finalement de la maturation du fromage. M. Weigmann a fourni d'importantes contributions à la solution de ces questions; son laboratoire a déjà fourni à un grand nombre de laiteries allemandes des cultures pures d'une espèce de bactérie qu'on emploie avec succès pour acidifier la crème.

En Danemark, M. le Professeur Storch a publié d'importantes recherches dans les mêmes sens, et MM. Quist et Zoffmann, directeurs de laboratoire, ont procuré à plusieurs laiteries scandinaves des cultures pures analogues à celles de M. Weigmann. En Autriche, c'est surtout M. le Professeur, D[r] Adametz qui a pris en main cette affaire. Sur ce point, il faut mettre aussi en relief les travaux antérieurs, importants au point de vue théorique, faits par le savant français, M. Duclaux et le savant allemand, M. Hueppe.




Même sur le terrain de la fabrication des tabacs, on commence aujourd'hui à appliquer le susdit principe. Il n'est aucun doute que, elles aussi, les autres branches d'industrie qui reposent plus ou moins sur la fermentation sous l'influence des bactéries, se rangeront bientôt parmi les précédentes. Ce qu'il y a de remarquable, c'est qu'à cet égard on n'a pas encore fait de démarches pour la fabrication du vinaigre.

Aux yeux de tout zymotechnicien qui s'est mis au courant des résultats de l'investigation moderne, il est clair maintenant que le but doit être le même partout où l'on utilise les organismes de la fermentation, c'est-à-dire qu'on doit chercher à abandonner l'ancien procédé dans lequel le hasard aveugle avait la haute main. Sur ce terrain entier vient de s'ouvrir une nouvelle ère.

*Août 1892.*

# Sur le développement des spores du Sacch. membranæfaciens, du Sacch. Ludwigii et du Sacch. anomalus.

Par

J. Chr. Nielsen.

M. le Professeur, Dr. Emil Chr. Hansen est le premier qui ait décrit ces trois espèces de Saccharomyces. A l'époque de cette description on ne connaissait aucune forme voisine. Parmi les Saccharomycètes examinés jusqu'alors, les trois espèces susdites occupaient un rang à part et bien défini: c'est qu'elles constituent les types de groupes tout à fait nouveaux dans ce genre. Si l'on désirait introduire de nouveaux noms, rien ne s'opposerait à les donner pour types de trois nouveaux genres. La publication des recherches de M. Hansen éveilla l'intérêt de divers savants pour l'étude de ces formes, et l'on se mit à rechercher celles-ci. Aussi réussit-on assez vite à trouver plusieurs variétés ou espèces qui se rattachent de près au Sacch. membranæfaciens et au Sacch. anomalus. C'est seulement dans ces derniers temps qu'on a trouvé des espèces voisines du Sacch. Ludwigii, savoir le Sacch. Comesii de M. Cavara et le Schizosaccharomyces Pombe de M. P. Lindner.

D'après un article publié en 1892 par M. J. Kœhler dans la V[e] livraison des „Mittheilungen Œsterr. Versuchsstation für Brauerei und Mälzerei, Wien", il a trouvé, dans l'eau sale d'un puits, une forme de levure qu'il prend pour l'identique du Sacch. membranæfaciens Hansen. Touchant l'espèce en question il nous apprend qu'elle donne des spores à 25° C. au bout de 41 heures, à 9° C. au bout de 10 jours; mais ces déterminations faites par Kœhler ne concordent pas avec celles que j'ai faites du Sacch. membranæfaciens Hansen.

Dans les „Annali della R. Scuola di Viticoltura e di Enologia in Conegliano", série III, fasc. II, 1892 (dont on trouve un compte rendu dans le Botan. Centralblatt, vol. LIV, 1893, p. 9), le Dr. P. Pichi a décrit et représenté deux nouvelles espèces de très proche parenté avec le Sacch. membranæfaciens. Il n'y a que de petites différences; mais comme M. Pichi a confronté cette dernière espèce à l'aide de spécimens procurés directement par M. Hansen lui-même, on doit admettre que ces différences suffisent à distinguer les trois espèces. Sur l'évolution des spores à diverses températures, M. Pichi ne communique rien.

Des formes qui se rattachent au Sacch. anomalus Hansen, ont été trouvées à plusieurs reprises durant ces derniers temps, par ex., à Berlin par MM. P. Lindner et Zeidler, à Munich par M. H. Will, et à Copenhague dans le laboratoire de M. Alfred Jörgensen. Ces formes sont-elles identiques ou seulement apparentées au Sacch. anomalus Hansen? Il est impossible d'en décider pour le moment, car aucun des susdits savants n'a décrit en détail les formes qu'il a observées. Pour rendre possible une comparaison profitable, il sera important aussi de poursuivre la recherche de nouveaux traits caractérisant les espèces établies par Hansen.

Dans son mémoire de 1883 sur la formation des ascospores du genre Saccharomyces (Compte-rendu du Laboratoire de Carlsberg, vol. II, 2e livraison), Hansen a montré que si, dans l'évolution des spores, les courbes de température ont essentiellement la même forme, les points fondamentaux, surtout ceux que déterminent les températures maxima et minima, nous donnent des marques distinctives caractéristiques pour la classification des espèces. Plus tard, d'autres investigateurs ont confirmé la justesse de cette assertion. A diverses reprises, Hansen a prémuni contre la méprise qu'on a commise assez souvent et qui consiste à se contenter de ce caractère seul pour définir les espèces de Saccharomyces. De plus, Hansen a découvert toute une série d'autres caractères empruntés à différentes sources.

M. Monal, chef de laboratoire, adjoint à l'école de brasserie récemment fondée et réliée à l'Université de Nancy, a fait des études dans notre laboratoire en 1892, et de concert avec moi il a commencé une recherche sur la marche évolutionnaire des spores des trois espèces déjà souvent mentionnées. Ce travail a été repris plus tard et achevé par moi seul durant l'hiver de 1892 à 1893.

A l'effet de ces recherches les trois espèces ont été cultivées dans le moût de bière. Après avoir obtenu, au bout d'une culture de 20 à 24 heures et à 26° C., des cellules jeunes et vigoureuses, je les ai semées sur des blocs de plâtre et, ceux-ci étant assez imbibés d'eau

pour que leur surface reluisît faiblement, j'ai mis le tout dans le thermostat aux températures désirées. Bref, j'ai suivi le procédé indiqué par Hansen dans son mémoire ci-dessus cité.

Voici le résultat de mes recherches:

Sacch. membranæfaciens. Hansen.

| | | | |
|---|---|---|---|
| A | 35° C. | pas de développement de spores. | |
| - | 33—33$^{1}/_{2}$° C. | premiers rudiments distincts, au bout de | 19—21 heures. |
| - | 32$^{1}/_{2}$° C. | — — — — | 18 — |
| - | 30$^{1}/_{2}$—31° C. | — — — — | 17—18 — |
| - | 30° C. | — — — — | 17—18 — |
| - | 28° C. | — — — — | 17$^{1}/_{4}$—18 — |
| - | 25° C. | — — — — | 17$^{1}/_{4}$—18 — |
| - | 7$^{1}/_{2}$—8$^{1}/_{2}$° C. | — — — — | 4$^{1}/_{2}$—5 jours. |
| - | 6—7$^{1}/_{2}$° C. | — — — — | 6—7 — |
| - | 2$^{1}/_{2}$—3° C. | pas de développement de spores. | |

En faisant les recherches ci-dessus j'ai trouvé que la formation des spores était beaucoup plus précoce que ne l'indique Kœhler. Mes recherches terminées, mon collègue, M. Klöcker, a eu la bonté de m'informer comment il a trouvé une explication naturelle, me semble-t-il, de la différence entre les résultats de Kœhler et les miens. Dans ses expériences, Kœhler avait employé les blocs d'argile que recommande Wichmann, et moi, comme je l'ai dit, les blocs de plâtre dur qui, tant ici au Laboratoire qu'ailleurs, sont généralement employés à de telles expériences. Klöcker sema des cellules provenant d'une même végétation de Sacch. membranæfaciens, à la fois sur lesdits blocs d'argile et sur ceux de plâtre, et dans des conditions identiques.

Une première expérience sur des cellules un peu affaiblies donna pour résultat qu'après un séjour de 18 heures à 25° C., on ne trouva de spores ni sur les blocs de plâtre ni sur ceux de Chamotte. Au bout de 24 heures, au contraire, des spores s'étaient développées sur le plâtre, tandis qu'on n'en trouvait encore aucune sur l'argile. C'est seulement au bout de 65 heures qu'on en trouva un très petit nombre sur ce dernier support. La seconde expérience fut faite sur une végétation jeune et vigoureuse, et du reste de la même manière. Au bout de 18 heures, Klöcker trouva des spores sur les deux blocs de plâtre, bien qu'en petit nombre, ce qui concorde avec mon observation, tandis qu'il n'y en avait aucune sur les blocs d'argile, qui, au bout de 24 heures, n'en présentaient encore point. Au bout de 41 heures, l'un des blocs d'argile en était abondamment pourvu, de même que

les deux blocs de plâtre; l'autre bloc d'argile n'en présentait que très peu.

L'évolution fut donc dans tous les cas considérablement plus tardive sur les blocs d'argile que sur ceux de plâtre. Si Klöcker est arrivé au même résultat que moi en employant comme moi des blocs de plâtre, et au même résultat que Kœhler en se servant comme lui de blocs d'argile, il me faut plutôt en conclure que Kœhler et moi, nous avons opéré sur la même espèce, et que la différence entre ses recherches et les miennes provient de la différence de dispositif des expériences. On voit par là combien il est important d'effectuer ce genre de recherches d'après une même méthode[1]).

[1]) Déjà il y a peu d'années, j'ai fait une longue série d'essais analogues avec divers blocs d'argile, préparés à la manufacture de porcelaine de Bing à Copenhague. La plupart de ces blocs ont donné un résultat de beaucoup inférieure à celui des blocs de plâtre; pour une seule série de ces blocs d'argile le résultat général a été aussi bon que celui des blocs de plâtre. Les essais ont été faits sur le Sacch. Pastorianus I Hansen. Quand je quittai le Laboratoire Carlsberg, M. Klöcker continua ces expériences, et m'a fait l'amitié de mettre à ma disposition les résultats qu'il a obtenus. Dans le „Centralblatt f. Bakteriologie u. Parasitenkunde" 1893, MM. Wichmann et Elion recommandent l'emploi de blocs en argile (respectivement „Chamotteblöcke" et „Thonwürfel") aux blocs de plâtre. Klöcker fit donc une longue série d'expériences comparatives avec les blocs d'argile recommandés par ces deux auteurs et avec les blocs de plâtre ordinaires. Des expériences furent faites tout à fait dans les mêmes conditions et exactement sur la même végétation de levure de manière à pouvoir attribuer à coup sûr aux blocs seuls la différence qui se manifesterait. Il pratiqua ces expériences sur les deux espèces Hansen, savoir: le Sacch. ellipsoïdeus II et la levure basse Carlsberg nº 2. Sur les blocs Chamotte de Wichmann, les spores se développaient toujours plus tard que sur le plâtre et en nombre beaucoup moindre, donnant par conséquent le résultat obtenu, comme on l'a dit plus haut, avec le Sacch. membranæfaciens. Les „Thonwürfel" d'Elion servirent mieux: aux points de vue considérés, il n'y eut pas de différence essentielle entre ses résultats et ceux des blocs de plâtre.

La formation des spores est, comme toute autre fonction, soumise à des oscillations, déterminées non seulement par les variations possibles de l'état des cellules, mais encore par le fait que les expériences ne sont pas toujours disposées exactement de la même manière. Si, par exemple, on a une forte série de blocs, ils ne se comporteront pas tout à fait de même: tels favoriseront plus que tels autres le développement des spores. Ce sont donc encore là des causes d'oscillation. Or, Klöcker trouva par ses expériences qu'en moyenne ces oscillations sont moindres pour les blocs de plâtre que pour les blocs d'argile, même quand on établissait la comparaison à l'aide des meilleurs blocs d'argile. En conséquence, il n'y a aucun motif pour abandonner les blocs de plâtre.

### Sacch. Ludwigii. Hansen.

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | $34^{0}$ C., pas de développement de spores. | | | | | | |
| - | $32-32^{1}/_{2}{}^{0}$ C., premiers rudiments distincts au bout de | | | | | 19—21 | heures. |
| - | $30^{1}/_{2}-31^{0}$ C. | — | — | — | — | 18—20 | — |
| - | $30^{0}$ C. | — | — | — | — | 18—19 | — |
| - | $28^{0}$ C. | — | — | — | — | 19—20 | — |
| - | $25^{0}$ C. | — | — | — | — | 20—21 | — |
| - | $7^{1}/_{2}-8^{1}/_{2}{}^{0}$ C. | — | — | — | — | 7—8 | jours. |
| - | $6-7^{1}/_{2}{}^{0}$ C. | — | — | — | — | 13—14 | — |
| - | $2^{1}/_{2}-3^{0}$ C., pas de développement de spores. | | | | | | |

### Sacch. anomalus. Hansen.

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | $34^{0}$ C., pas de développement de spores. | | | | | | |
| - | $32-32^{1}/_{2}{}^{0}$ C., premiers rudiments distincts au bout de | | | | | 19—21 | heures. |
| - | $30^{1}/_{2}-31^{0}$ C. | — | — | — | — | 18—19 | — |
| - | $30^{0}$ C. | — | — | — | — | 17—19 | — |
| - | $28^{0}$ C. | — | — | — | — | $17^{1}/_{2}$—19 | — |
| - | $25^{0}$ C. | — | — | — | — | 18—20 | — |
| - | $7^{1}/_{2}-8^{1}/_{2}{}^{0}$ C. | — | — | — | — | 7 | jours. |
| - | $6-7^{1}/_{2}{}^{0}$ C. | — | — | — | — | 13—14 | — |
| - | $2^{1}/_{2}-3^{0}$ C., pas de développement de spores. | | | | | | |

En comparant les courbes de température ci-dessus pour les trois espèces, nous trouvons que le maximum de température pour la formation de spores est un peu plus haut pour le Sacch. membranæfaciens que pour les deux autres, tandis que pour ces dernières ledit maximum est le même. La température optima est à peu près la même pour toutes les trois et dépasse un peu celle des espèces étudiées par Hansen. En considérant de plus près les courbes de température du Sacch. Ludwigii et du Sacch. anomalus, on trouvera qu'aux basses températures de $7^{1}/_{2}-8^{1}/_{2}{}^{0}$ et de $6-7^{1}/_{2}{}^{0}$ C., une différence de 1 à 2 degrés dans ces températures a donné une différence de 5 à 6 jours pour la formation des spores. En ce qui concerne le minimum de température, on peut présumer qu'il se trouve dans le voisinage de $6^{0}$ C., pour le Sacch. Ludwigii et le Sacch. anomalus, et que pour le Sacch. membranæfaciens il est vraisemblablement un peu plus bas. A $3^{0}$ C., il ne se développa de spores en aucun cas dans les trois espèces.

Le Sacch. Ludwigii et le Sacch. anomalus nous donnent des exemples d'espèces qui, au point de vue purement morphologique, se détachent nettement les unes des autres (et, comme on se le rappelle, il y a, chez ces deux espèces, une différence manifeste entre la forme des spores, celle des cellules végétatives et la germination des spores) et qui peuvent

présenter malgré cela des courbes de température essentiellement semblables pour le développement des spores. Les recherches relatives à d'autres espèces et faites par MM. Hansen, Will, Grönlund et autres, font cependant constater que le contraire aussi peut arriver, savoir que des espèces impossibles à différencier entre elles par les caractères morphologiques, peuvent présenter de grandes différences précisément dans le sens indiqué.

Or, comme, d'après ce qu'on en a dit plus haut, les types découverts par Hansen voient se grouper autour d'eux tout un cercle d'espèces et de variétés nouvelles, il est important que de tous les côtés possibles on recherche les caractères de ces espèces. Mon travail est une contribution dans ce sens, et j'ai appuyé spécialement sur la marche évolutionnaire des spores, parce qu'à cet égard ladite analyse est une des plus importantes.

# Recherches sur les bactéries acétifiantes.

(Second mémoire.)

Par

**Emil Chr. Hansen.**

## 1. Introduction historique.

La littérature concernant les bactéries acétifiantes contient deux ouvrages qui attirent tout spécialement notre attention. L'un est de M. Kützing, l'autre de M. Pasteur. Ce fut à une époque importante pour la microbiologie que, en 1837, Kützing publia ses recherches microscopiques sur la levure et la mère du vinaigre [1]. Car, peu auparavant, les recherches par lesquelles Cagniard Latour et Theodor Schwann firent époque, avaient établi que la levure alcoolique consiste en cellules vivantes et que ce sont elles qui suscitent la fermentation alcoolique. Dans le mémoire susdit, Kützing décrivit et figura une bactérie acétifiante appelée par lui Ulvina aceti. Page 390 il la décrit comme composée de très petites boules qui parfois semblaient alignées, et la plupart du temps gisaient pêle-mêle sans ordre déterminé; mais en tous les cas elles étaient enveloppées d'une matière gélatineuse. Il vit que la mère du vinaigre s'accroissait, et son observation le conduisit à ce résultat que, de même que la fermentation alcoolique est due à la levure, de même la „fermentation acétique" est due à la mère du vinaigre. Kützing voit, aussi bien dans la levure alcoolique que dans la mère du vinaigre, des organismes pullulant et effectuant un travail chimique défini: une fois produits, il peuvent, comme tout autre organisme, se propager par ensemencement. Mais Kützing commet la faute de penser qu'ils peuvent surgir par génération spontanée, et à cet égard il a par conséquent une tout autre opinion que

[1]) Kützing, Microscopische Untersuchungen über die Hefe und Essigmutter. (Journal für praktische Chemie, Jahrg. 1837, Zweiter Bd., p. 385.)

Schwann. Car, par ses expériences sur la levure alcoolique, ce dernier montra que Spallanzani avait raison de prétendre qu'il ne se produisait pas de génération spontanée.

Ce fut seulement vingt-cinq ans plus tard qu'un progrès notable se réalisa sur ce terrain, lorsque M. Pasteur publia ses études sur la fermentation de l'acide acétique et la fabrication du vinaigre [1]). Selon Pasteur, la formation de l'acide acétique est suscitée par un microorganisme qui consiste en bâtonnets courts, généralement rétrécis au milieu et rangés en chaînes. En raison de ce rétrécissement, l'apparence peut souvent faire croire qu'on a sous les yeux de petites boules. En 1852, le chimiste Thomson avait publié sur l'action chimique de la mère du vinaigre une recherche dans laquelle il remplaça par le nom de Mycoderma la dénomination générique d'Ulvina donnée par Kützing; ce nouveau nom fut adopté par Pasteur.

M. Pasteur fit une longue série d'expériences sur ces bactéries, dont, en certains cas, il se procura de la semence en prenant simplement un peu de vinaigre ordinaire qui contenait les cellules. En d'autres cas il emprunta à une culture préalable, par ex. en ajoutant un peu d'acide acétique à du vin; car il avait observé qu'en pareilles circonstances, l'antagoniste ordinaire, le Mycoderma vini, succombait, et qu'il en était également ainsi des bactéries qu'on trouve généralement dans le vin: il ne compte pas le Mycoderma aceti parmi les bactéries. Les essais de M. Pasteur semblent avoir été faits, au moins dans la plupart des cas, avec une ou plusieurs des espèces communes dans le vinaigre et qui peuvent tantôt se présenter comme membranes, tantôt remplir le liquide nourricier d'une substance gélatineuse cartilagineuse et tenace. Pourtant il y a aussi des indications qui peuvent suggérer que dans ses cultures il a eu des bactéries appartenant aux espèces qui se distinguent par la formation rapide d'un voile mince à la surface du liquide nourricier, et ne peuvent produire, par immersion dans ce liquide, les Zooglées singulières susmentionnées. On doit se rappeler qu'à l'époque où M. Pasteur fit ses expériences, il n'était pas encore question de produire des cultures pures de microorganismes. Le plus qu'on pût obtenir avec quelque certitude par les procédés qu'il employait, c'était d'en amener les cultures à contenir seulement les bactéries auxquelles est due la fermentation acétique. et même ce

[1]) Pasteur, Études sur le vinaigre. Paris, 1868. Dans ce livre se trouve imprimé son „Mémoire sur la fermentation acétique", extrait des „Annales scientifiques de l'École Normale supérieure". T. 1, 1864. Dès 1862, M. Pasteur avait publié, dans les Mémoires de l'Académie de Paris, une brève communication de ces recherches.

résultat n'était pas toujours sûr; mais, opérait-il, dans ses expériences, sur une ou plusieurs espèces? Il ne pouvait en savoir absolument rien!

En ce temps-là, les chimistes, Liebig en tête, ne voulaient généralement pas convenir que l'activité vitale d'êtres microscopiques pût causer une oxydation à l'alcool; mais Thomson, cité plus haut, fit exception parmi ces savants. Cependant les expériences ingénieuses de M. Pasteur établirent que Liebig avait méconnu l'importance des microorganismes. Quant à la question des copeaux, dans la méthode allemande de fabrication rapide du vinaigre („Schnellessigfabrikation") il arriva à ce résultat qu'à eux seuls ils ne sont pas à même de susciter des acétifications. Quand sous l'influence de l'air les liquides alcooliques se transforment en acide acétique, ce sont constamment des cellules vivantes de Mycoderma aceti qui en sont la cause. Dans un ou deux passages de son ouvrage, il émet l'idée que les bactéries acétifiantes fonctionnent de la même manière que le platine finement divisé. Ainsi, p. 99, il fait ressortir qu'il n'attribue pas une action physiologique au voile mycodermique. „Je crois, dit-il, que sa fonction de transport de l'oxygène de l'air sur l'alcool, l'acide acétique, etc., tient à sa structure propre." Mais, sur ce qui, dans cette structure, doit déterminer cette propriété, il ne donne aucun éclaircissement. Ses essais ont montré que le Mycoderma aceti engendre, non seulement de l'acide acétique, de l'eau et de l'acide carbonique, mais encore d'autres substances, notamment de l'aldéhyde, et sans doute aussi de l'acide succinique. Tant que l'alcool est là, lui seul pour ainsi dire est oxydé; mais quand l'alcool a disparu du liquide, c'est l'acide acétique qui subit la combustion et se transforme par là en eau et en acide carbonique. Fait-on reparaître l'alcool dans le liquide, c'est alors cet alcool qui est oxydé aussitôt et transformé en acide acétique, tandis que l'acide acétique présent est soustrait à l'influence. La plante microscopique dont nous nous occupons ici, est donc capable d'attaquer, non seulement l'alcool, mais encore l'acide acétique dont elle a causé elle-même la formation, et elle fait son choix.

Nous avons ainsi obtenu un coup d'œil sur les plus essentielles des recherches théoriques de M. Pasteur sur le terrain en question et vu quelle série de résultats importants elles ont produits: leur importance s'accroît encore pour nous par la pensée que ces mêmes recherches furent faites il y a plus de trente ans.

Ce fut principalement les dégâts causés dans les fabriques de vinaigre en France par l'anguillule du vinaigre, qui firent entamer à M. Pasteur l'élaboration d'un nouveau procédé, destiné surtout à remplacer, selon lui, l'ancienne méthode orléanaise d'après laquelle la fermentation se fait en fûts, à vrai dire, largement pourvus de liquide,

sans toutefois être tout à fait pleins. A intervalles convenables, on soutire une certaine quantité de vinaigre et la remplace par son équivalent en vin. La formation de l'acide acétique se fait assez lentement, et il arrive que, de la manière décrite, les mêmes fûts servent pendant plusieurs années de suite sans être entièrement vidés et, par conséquent, aussi sans être nettoyés. Le principe du procédé de M. Pasteur consiste en ce qu'il emploie des cuves plates au lieu de fûts. La masse liquide enfermée dans ces cuves a, comparativement à ce qui a lieu dans le procédé orléanais, une surface relativement beaucoup plus grande, c'est-à-dire les conditions les plus favorables à l'évolution de la membrane du Mycoderma. En pareilles circonstances l'oxydation se produit avec une grande activité, quand on pourvoit à ce que l'air afflue suffisamment et que la température soit convenable. De cette manière l'acétification s'opère beaucoup plus rapidement qu'en fûts, et les anguillules du vinaigre n'ont pas lieu de se développer. En raison de la rapidité de la production, chaque cuve n'est aussi employée que peu de temps à la fois; on peut donc les nettoyer plus souvent que les fûts à l'orléanaise. Quand la fabrication est en train, M. Pasteur prend de la semence dans telle ou telle des membranes qui se trouvent déjà dans les autres cuves. Si, au contraire, on va débuter, il se procure la végétation désirée en exposant à l'influence directe de l'air un liquide contenant de l'alcool et un peu d'acide acétique, par ex. le mélange susmentionné de vin et de vinaigre. Lorsque plus loin on parlera de la communication de M. Wurm, le procédé Pasteur sera mentionné de nouveau. M. Pasteur recommande, pour rendre le vinaigre de bonne garde, l'emploi de la méthode de chauffage indiquée en 1782 par Scheele.

En 1873, MM. Knieriem et Mayer publièrent quelques recherches qui se rattachent aux précédentes de M. Pasteur[1]), et où ils font d'abord remarquer que le platine finement divisé n'agit pas dans les mêmes conditions que le Mycoderma aceti. Tout comme M. Pasteur, ils trouvèrent que les copeaux, le papier à filtrer et des substances analogues sont incapables de provoquer l'acétification. Ils en vinrent à conclure que la fermentation acétique se relie très intimement à l'activité vitale des êtres microscopiques et n'est point un simple procédé de chimie et de physique, sans toutefois rien dire de la manière dont se passe cette fermentation. Ils émettent l'opinion juste qu'on doit compter le Mycoderma aceti parmi les bactéries. A la fin de leur mémoire, ils renvoient à l'hypothèse possible qu'il se

[1]) Knieriem und Mayer, Ueber die Ursache der Essiggährung. (Die landwirtschaftlichen Versuchsstationen, vol. XVI, 1873, p. 305.)

trouve diverses bactéries capables de faire transformer l'alcool en acide acétique; toutefois c'est en vain qu'ils ont cherché à découvrir ces prétendues espèces.

Le premier travail que nous rencontrions ensuite, fut publié par M. Pfund, chimiste allemand, et adopte principalement une direction pratique [1]). L'auteur y fait une revue assez détaillée de l'acétification allemande dite „Schnellessigfabrikation" et penche pour l'opinion que les bactéries ne sont aucunement nécessaires quand on opère d'après cette méthode.

Au point où l'investigation en était alors arrivée, la question devait alors être de soumettre les bactéries acétifiantes mêmes à un examen plus approfondi que les précédents sous le rapport botanique. Vers la fin de 1878, j'ai publié dans ma thèse de docteur une contribution dans ce sens et qui l'année suivante a paru dans le Compte-rendu du Laboratoire Carlsberg [2]). Mes recherches donnèrent dans les deux sens de nouveaux éclaircissements; car elles montrèrent que sous le nom de Mycoderma aceti se cachaient au moins deux espèces nettement distinctes et que ces espèces se présentaient avec une très grande richesse de formes.

Ce fut la manière différente dont les membranes se comportaient vis-à-vis de l'iode et de l'iodure de potassium iodé, qui m'apprit qu'en tout cas il devait y avoir en présence deux espèces, car en pareilles circonstances les voiles donnaient respectivement des réactions jaune et bleue. Aux végétations à réaction jaune, je conservai l'ancien nom de Mycoderma aceti, et donnai aux autres la nouvelle dénomination de Mycoderma Pasteurianum d'après mon illustre prédécesseur.

Outre les chapelets de petites bactéries décrites par Kützing et Pasteur, je trouvai aussi, dans ces espèces, de longs bâtonnets et de très longs filaments, tantôt rectilignes, tantôt diversement entortillés, et finalement des cellules renflées de formes très diverses, bref, la plus grande variété. La fig. 1 ci-joint reproduit les illustrations qui accompagnent mon mémoire ci-dessus mentionné. Pour obtenir des cultures pures de ces deux espèces, j'ai employé la méthode suivante: des verres au $^{3}/_{4}$ remplis de bière basse de garde ou de bières à haute fermentation, furent placés dans un thermostat à une température voisine de 34° C. En effet, j'avais fait l'observation que, dans les susdites circonstances, la surface de ces liquides se couvrait d'une membrane qui, examinée au microscope, paraissait n'être généralement

[1]) Paul Pfund, Theorie und Praxis der Schnellessigfabrikation. (Dinglers polyt. Journal. vol. 211. année 1874, p. 280.)

[2]) Emil Chr. Hansen, Mycoderma aceti et Mycoderma Pasteurianum nov. sp. (Compte-rendu du Laboratoire Carlsberg, vol. I, 2e livr., 1879, p. 96.)

composée que de bactéries acétifiantes. Le Mycoderma aceti figurait pour ainsi dire toujours dans la bière de garde, et n'était pas rare non plus dans la bière à haute fermentation. Cette fois-ci le Mycoderma Pasteurianum ne se présenta à mon observation que dans cette dernière bière, et encore pas toujours, tant s'en fallait. Une trace de ces membranes fut inoculée dans des liquides nourriciers stérilisés, protégés contre l'infection du dehors. La culture fut constamment pratiquée à la susdite température favorable, et se répéta plusieurs fois. Dans les nombreux essais d'ensemencement que je fis

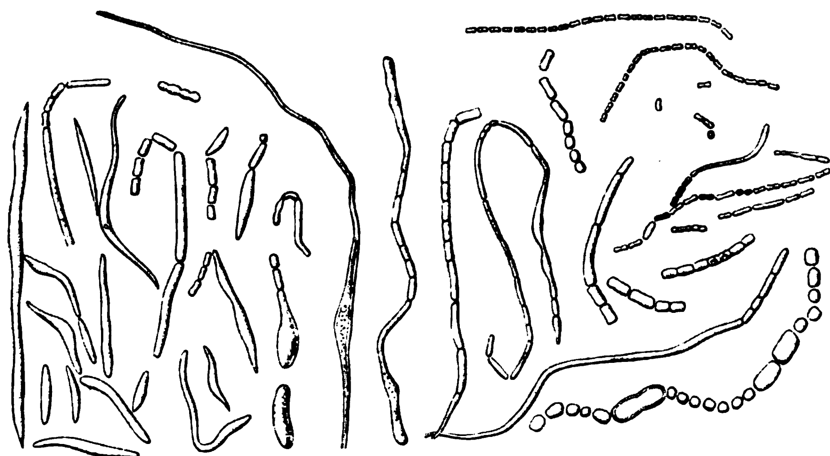


Fig. 1.

avec les deux espèces, chacune à part, et en séries parallèles, j'obtins constamment une végétation de Mycoderma Pasteurianum, en tant que celui-ci existait dans la semence, et dans le cas contraire, une végétation de Mycoderma aceti. C'était là un signe que, non seulement j'avais réussi à produire des cultures pures de mes bactéries acétifiantes, mais qu'on devait aussi les concevoir comme espèces réellement différentes. Dans la bière, ces cultures causaient une forte acétification.

A l'époque où parut mon mémoire, la question du pléomorphisme des bactéries était à l'ordre du jour. La plupart des savants qui participèrent à cette discussion, se bornèrent toutefois à communiquer des observations au microscope sur les formes constatées dans les végétations occasionnellement rencontrées et qui faisaient l'effet d'être suffisamment pures. En cela on basa principalement son jugement sur une évaluation plus ou moins douteuse. Mes recherches citées

plus haut se rangent parmi les premières preuves expérimentales fournies de la possibilité qu'une seule et même espèce figure avec toute une série de formes très différentes. La justesse de mon observation fut plus tard confirmée par De Bary (Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozoen und Bacterien, 1884), Zopf (Die Spaltpilze, 1884), Adrian-J. Brown (voir les mémoires mentionnés dans la suite) et autres. Jusqu'à ce jour on n'a pas fourni, en ce sens, de nouvelles contributions. Dans son système, Zopf rapporte les bactéries acétifiantes au genre Bacterium, dénomination préférable aussi au nom de Mycoderma.

Un an après l'apparition de mon mémoire susmentionné, M. Wurm publia un rapport sur quelques essais qu'il avait faits dans une vinaigrerie de Breslau suivant le procédé Pasteur [1]). Il observa que la végétation n'avait pas toujours le même aspect dans les membranes, car elle consistait soit en petites cellules arrondies, en micrococci, soit en une forme de Bacillus, soit en de longs filaments gonflés; mais il fait ressortir qu'il lui était impossible de décider si ces divers types appartenaient à une ou à plusieurs espèces. Il fit ses recherches au microscope dans le laboratoire de M. F. Cohn. Lui aussi, ce célèbre bactériologue avait fait des observations analogues à celles de Wurm, mais sans obtenir plus de clarté sur l'enchaînement des choses. Que plus d'un an auparavant j'eusse soumis cette question à une recherche expérimentale, c'est un fait qui a échappé à l'attention de ces messieurs. Il se peut que Wurm se soit vu en face d'une série d'évolutions pareille à celle que j'avais décrite. De même aussi, la considération de l'imperfection de sa manière de diriger les cultures, rend probable qu'il se trouvait en présence de plusieurs espèces qui n'appartenaient même pas toutes au groupe des bactéries acétifiantes.

Comme avantages spéciaux du procédé Pasteur, Wurm met en relief la rapidité de la production obtenue; on dit cette production deux fois plus rapide que la fabrication allemande; en outre, les anguillules du vinaigre n'ont pas le temps de se multiplier notablement, car les cuves ne séjournent pas plus de 10 à 15 jours. C'est seulement à la fin de sa communication qu'il touche aux difficultés entraînées par le nouveau procédé. Si l'addition d'alcool dans les cuves ne se fait pas comme il faut, quand la fermentation est en train, cette dernière peut être non seulement entravée, mais encore tout à fait arrêtée. Wurm pense que le procédé Pasteur réussira particulièrement bien pour fabriquer le vinaigre de vin, et à cet égard il renvoie à la

---

[1]) Emanuel Wurm, Ueber Essigbildung mittels Bakterien. (Dinglers polyt. Journal, vol. 235, ann. 1880, p. 225.)

communication que Breton-Laugier a donnée de ses propres expériences faites à Orléans. (Dinglers polyt. Journal, vol. 201, ann. 1871, p. 67.) Breton-Laugier employait des cuves plates de 125 litres, remplies d'un mélange de vinaigre et de vin clair. A la surface de ce liquide on mit soigneusement avec une spatule en bois une jeune végétation de membranes, de manière à ce qu'elle se répandît à la surface du liquide sans s'y enfoncer. La température du local était de 20 à 25° C. Au bout de 9 à 10 jours l'alcool présent était transformé en vinaigre. Dans ce même temps il se produisit sept fois plus de vinaigre que par le procédé à l'orléanaise, mais le nouveau vinaigre n'était pas aussi aromatique.

M'étant informé, il y a un an, auprès d'experts de Breslau sur le résultat des expériences de Wurm, on me répondit qu'elles n'avaient mené à rien. En France, la préparation du fameux vinaigre de vin s'effectue constamment d'après l'ancienne méthode orléanaise, et en d'autres pays c'est principalement la méthode allemande souvent mentionnée (Schnellessigfabrikation de Schützenbach) qu'on emploie. La cause pour laquelle la méthode Pasteur n'a pu gagner du terrain en pratique, doit résider, autant que je puis le supposer, dans ce que d'une part elle ne fournit pas un produit aussi fin que la méthode d'Orléans, et d'autre part elle réclame plus de surveillance que ne le font le procédé orléanais et la „Schnellessigfabrikation“ allemande.

Dans ses prétentions à la semence, Wurm n'alla pas plus loin que Pasteur; il la considère comme pure quand elle est exempte d'anguillules de vinaigre, de Mycoderma cerevisiæ et de Mycoderma vini. L'idée de choisir méthodiquement une espèce ou race définie et favorable, n'avait point du tout surgi alors dans l'industrie zymotechnique. Aujourd'hui il s'est passé dix ans depuis que j'ai implanté ce principe sur le terrain de la fermentation alcoolique; mais dans la fabrication du vinaigre il ne s'est fait aucun progrès à cet égard: à l'heure qu'il est, tout comme auparavant on laisse le hasard aveugle effectuer les fermentations. Et pourtant il y a beaucoup d'arguments pour qu'en opérant avec une culture pure d'une espèce choisie, on obtienne non seulement plus de sûreté que jusqu'ici dans cette fabrication, mais aussi une fermentation rapide et un produit fin.

En même temps que Wurm publiait ses recherches techniques dont on a parlé plus haut, paraissait un mémoire [1]) dans lequel l'auteur, M. Boutroux, informait que si, dans un liquide nourricier alcoolique,

[1]) Boutroux, Sur une fermentation nouvelle du glucose. (Comptes rendus, t. 91, 1880, p. 236.)

le Mycoderma aceti forme du vinaigre, c'est de l'acide gluconique qu'il forme au sein d'une solution de glucose dans de l'eau de levure. Plus tard il a désigné sa bactérie comme une espèce particulière, le Micrococcus oblongus.

Une série de recherches importantes sous le rapport chimique furent publiées en 1886 et 1887 par M. Adrian-J. Brown[1]). Le plus intéressant des résultats qu'elles fournirent, fut l'apparition de la lévulose comme produit principal du procès d'oxydation suscité par le Bact. aceti dans une solution de mannite. Ces belles expériences nous rendent possible de transformer la dextrose en lévulose. Dans le second des mémoires précités, M. Brown décrit ce qu'on appelle „vinegar plant" et qui se présente soit comme une masse gélatineuse, soit comme une membrane résistante et épaisse. Quoi qu'il en soit, les membranes formées par le Bacterium aceti différaient manifestement de celles du „vinegar plant". Les Zooglées de cette dernière espèce donnèrent, par le traitement à l'acide sulfurique concentré et à l'iode ou au chlorure de zinc iodé, une réaction bleue, et une étude chimique plus approfondie révéla aussi que cette masse consistait principalement en cellulose. C'est pourquoi M. Brown appela sa nouvelle espèce Bacterium xylinum.

Durant les années qui suivirent immédiatement, d'autres espèces furent décrites par MM. Peters, Zeidler et Wermischeff; des contributions en divers sens furent en outre fournies par MM. Giunti, Hirschfeld, Tolomei, Steinmetz, Jörgensen et Holm.

M. Lafar découvrit une levure qui forme une membrane comme le Mycoderma cerevisiæ, mais se distingue en ce qu'elle donne une puissante fermentation acétifiante. A l'égard de ces recherches, ainsi que de plusieurs autres points dans ce qui précède, on voudra bien se reporter au texte danois. Nous pouvons attendre de M. Lafar, dans un avenir très prochain, des recherches profondes sur les bactéries de la „Schnellessigfabrikation".

Avant de terminer cette introduction historique, je puis en dernier lieu citer qu'au Congrès tenu en septembre à Nuremberg par les naturalistes allemands (voir „Berichte der deutsch. botan. Gesellschaft", 1893) et à la séance du 17 novembre 1893 de l'Académie Royale des Sciences de Danemark, j'ai communiqué un aperçu des résultats les

[1]) Adrian J. Brown, The chemical action of pure cultivations of Bacterium aceti. (Journal of the Chem. Society, vol. XLIX, 1886. p. 172.) — On an acetic ferment which forms cellulose. (ibid., p. 432.) — Further notes on the chemical action of Bact. aceti. (ibid., 1887, p. 638.) — Note on the cellulose formed by Bact. xylinum. (ibid., p. 643).

plus importants que présentent, dans leur partie concernant l'évolution, mes nouvelles recherches, communiquées dans ce qui suit.

## 2. Recherches morphologiques et physiologiques.

### Méthode d'investigation.

Mes nouvelles recherches ont été faites surtout avec les deux espèces précitées: Bact aceti et Bact. Pasteurianum, ainsi qu'avec une troisième espèce que j'ai appelée Bact. Kützingianum du nom de l'illustre botaniste qui découvrit les bactéries acétifiantes. Il va de soi que ces expériences ont été constamment faites avec des cultures absolument pures, et dans des milieux nourriciers stérilisés.

On a successivement essayé un très grand nombre de liquides et de gélatines nourricières de diverse composition; dans ce nombre, la bière double s'est montrée le plus favorable des milieux nourriciers. Aussi la plupart des expériences suivantes furent-elles faites avec ce liquide et, à moins d'indication contraire, la culture à laquelle il servit, s'est faite dans les matras dits de Freudenreich. Un matras cylindrique de ce genre contient $22^{cc}$; mais on ne le tint qu'à moitié rempli. Le tube qui traversait son chaperon fut tamponné de coton. La bière double est une sorte de bière à fermentation haute, relativement riche en extrait et pauvre en alcool; après la stérilisation elle contenait en volume environ 1% d'alcool. Assez souvent on employa aussi de la bière basse de garde, qui après la stérilisation contenait en volume 2 %, 8 d'alcool. Le moût employé était le moût ordinaire, houblonné (environ 13 % Ball.). Ce fut seulement par exception qu'on employa d'autres liquides nourriciers que les susdits. Comme substance nourricière solide j'ai employé la gélatine au moût, la gélatine à la bière double, la gélatine mélangée d'extrait de viande et de peptone et l'agar-agar à la bière double; les deux premières se composaient respectivement des susdits liquides nourriciers, avec addition de 7 % de gélatine. La gélatine mélangée d'extrait de viande et de peptone fut préparée d'après la recette de Koch (10 % de gélatine). L'agar-agar à la bière double qu'on a employé, se composait de bière double avec 2 % d'agar-agar.

### Les membranes et leurs cellules à 34° C.

Si les susdits matras à bière double sont ensemencés d'une végétation jeune et vigoureuse, provenant des trois espèces, et qu'on tienne les cultures à 34° C., au bout de 24 heures il se sera formé des

membranes formant voile complet. Ces membranes sont si différentes d'aspect qu'il suffit de l'avoir remarqué pour pouvoir toujours discerner avec certitude telle espèce de telle autre. La membrane du Bact. aceti est glaireuse, unie et tend à se marbrer légèrement, tandis que celle du Bact. Pasteurianum est sèche à la surface et prend bientôt rides et plis; elle s'élève aussi un peu plus haut que la précédente au-dessus de la surface du liquide. Le Bact. Kützingianum se rapproche plutôt du Bact. Pasteurianum, mais sa membrane s'élève fort au-dessus du liquide et grimpe le long de la paroi du matras. Dans tous les cas, la bière est parfaitement claire après la formation des voiles à la haute température mentionnée; mais si alors on abandonne les matras à la température ordinaire des habitations, la bière couverte du Bact. Kützingianum se ternit rapidement, tandis que la bière qui a les deux

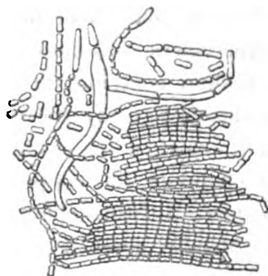


Fig. 2. *Bacterium aceti.*

Végétation provenant d'un voile récemment formé sur de la bière double. Grossissement linéaire de 1000 fois.

autres espèces, ne subit pas ce changement. Après un séjour prolongé, il se forme un précipité dans le matras au Bact. Kützingianum et la bière redevient claire: la croissance s'est alors probablement arrêtée.

Si nous comprenons également dans nos considérations les espèces qui ne forment que très difficilement des membranes, nous verrons nettement qu'en fait de croissance à la surface des liquides, les bactéries acétifiantes constituent toute une échelle.

En soumettant à l'examen microscopique les voiles récemment formés à 34° C. par des cultures sur de la bière double, nous trouvons que les végétations des trois espèces présentent un aspect quelque peu différent. Dans le Bact. aceti (fig. 2) la plupart des cellules apparaissent comme de petits bâtonnets sous forme de sablier; c'est seulement par exception qu'on trouve de longs bâtonnets ou de longs filaments, avec ou sans renflement; les petits bâtonnets sont

généralement arrangés par chaînes qui peuvent avoir une très grande longueur.

Le Bact. Pasteurianum (fig. 3) se distingue du précédent en ce que dans la plupart des cas les cellules sont plus grandes et surtout plus épaisses; dans cette espèce aussi, la forme en chaîne est la plus fréquente.

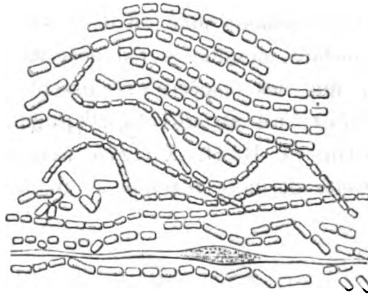


Fig. 3. *Bacterium Pasteurianum.*

Végétation provenant d'un voile récemment formé à 34° C. sur de la bière double. Grossissement linéaire de 1000 fois.

Dans le Bact. Kützingianum, c'est au contraire un cas rare que les petits bâtonnets soient réunies en chapelets; le plus souvent, ils sont libres ou réunis deux par deux.



Fig. 4. *Bacterium Kützingianum.*

Végétation provenant d'un voile récemment formé à 34° C. sur de la bière double. Grossissement linéaire de 1000 fois.

---

**Formation de la gelée.**

Les membranes décrites appartiennent aux formes de végétation qu'en bactériologie on appelle formations zooglées, c'est-à-dire où les cellules sont enveloppées de gelée. Chez les bactéries acétiques cette gelée est invisible à l'examen microscopique ordinaire, mais, par l'application d'un maniement convenable, par ex. de la méthode Lœffler, elle se dessine pourtant avec netteté (fig. 5).

En exerçant une pression sur ce genre de préparation, l'on voit en outre très fréquemment que les cellules s'échappent de la couche gélatineuse, ce qui donne alors naissance à un réseau gélatineux (voir la fig. 5, chaîne inférieure à gauche), essentiellement de même nature que celui que j'ai constaté, il y a quelques années, dans les Saccharomyces et autres levures.

Si aux préparations microscopiques contenant des parties de voiles, on ajoute de l'iodure de potasse iodé ou de l'iode en solution aqueuse ou alcoolique, on constate, comme je l'ai déjà fait ressortir dans mon mémoire de 1879, que les espèces réagissent diversement. Les gelées du Bact. aceti ne se colorent pas; mais celles des Bact. Pasteurianum et Bact. Kützingianum prennent une couleur bleue. Cette dernière réaction se manifeste surtout lorsque,

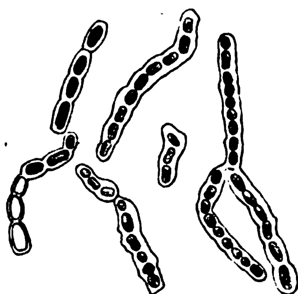


Fig. 5. *Bacterium Pasteurianum.*

Formation de gelée dans une végétation ancienne sur de la bière. Cellules traitées au mordant et à la coloration d'après la méthode Lœffler. Grossissement linéaire de 1000 fois.

par pression sur la lamelle couvre-objet on exprime latéralement les gelées d'entre les cellules. Il en résulte des taches plus ou moins colorées en bleu, tandis que les cellules ambiantes, ou bien échappent à la coloration, ou bien prennent une couleur jaune. Dans ces circonstances les préparations au Bact. aceti ne donnent donc qu'une couleur jaune, tandis que les préparations contenant les deux autres espèces, présentent non seulement cette réaction, mais encore, et bien plus forte, la réaction bleue. Je considère la matière glaireuse comme un prolongement immédiat de la paroi propre des cellules. Comment réagit la paroi même, c'est ce que l'exiguïté des dimensions de l'objet ne m'a pas permis de déterminer. Dans les grandes cellules gonflées on voit nettement dans toutes les espèces que le contenu est coloré en jaune. En général, les petites cellules ne montrent qu'une faible coloration en jaune, et parfois restent incolores.

Il n'y a encore qu'un petit nombre d'espèces de bactéries qui puissent notoirement donner la réaction bleue avec l'iode, et, parmi ces espèces, les deux que j'ai décrites sont les seules où ce soient les couches gélatineuses qui réagissent de ladite manière, tandis que, dans les autres espèces, c'est, autant qu'on puisse le voir par les descriptions, le contenu des cellules.

Le texte danois parle de conditions de culture dans lesquelles le Bact. Pasteurianum et le Bact. Kützingianum cessent de donner la réaction bleue. Tel est, par ex., le cas des végétations développées dans de l'eau de levure; mais l'addition d'un peu d'alcool ou de dextrose à ce liquide, donne plus d'énergie au développement, et la susdite réaction reparaît.

---

**Végétations sur gélatine nourricière.**

Dans une des sections précédentes nous avons vu que les trois espèces qui nous occupent ici spécialement, font naître, à la surface des mêmes liquides nourriciers, des voiles différant d'aspect, et qu'également les cellules de ces voiles présentent des différences. Cela nous a mis à même de distinguer telle espèce de telle autre. Des caractères de valeur analogue s'offrent aussi à notre observation, quand nous faisons la culture sur un milieu solide. J'y ai employé les gélatines ci-dessus nommées. En premier lieu vint une série de cultures sur plaque où la gélatine fut versée par couches assez minces dans les doubles vases de Petri; cette gélatine s'étant figée à la température ordinaire des habitations, les vases furent placés dans un thermostat à 25° C.

Les colonies cultivées sur la gélatine mélangée d'extrait de viande et de peptone, se faisaient remarquer par les zones laiteuses qui les environnaient. Chaque zone était séparée de sa colonie par une bande annulaire et claire. La surface des zones s'irisait assez promptement. L'aspect des colonies ne donnait que de faibles points d'appui pour distinguer entre les espèces, et cela est vrai aussi bien des expériences faites avec la gélatine au moût que de celles où servit la gélatine mélangée d'extrait de viande et de peptone. Dans ce sens, on trouva plus important l'examen au microscope des végétations elles-mêmes, surtout de celles de la gélatine au moût. Dans ce dernier milieu, la forme de chaîne avait été supplantée dans le Bact. aceti, tandis que, dans le Bact. Pasteurianum, elle était précisément la principale. Dans le Bact. Kützingianum, les petites bactéries libres en forme de bâtonnets se trouvaient présentes en majorité encore plus forte que dans le Bact. aceti.

On obtient une croissance plus énergique quand, dès le début, on dispose la semence à la surface de la gélatine solide. Ceci contient déjà une invitation à faire des expériences de cette manière aussi, et il s'y joint des motifs théoriques. Dans les cultures sur plaque, chaque colonie séparée provient, soit d'une cellule unique, soit d'un très petit nombre de cellules[1]). C'est pourquoi, dans beaucoup de cas, les colonies sont des images de la croissance, non pas de l'espèce, mais de l'individu, et par là représentent souvent une variation de l'espèce. Dans la littérature bactériologique on a aujourd'hui de nombreuses observations montrant qu'une même espèce peut figurer avec des colonies d'aspects divers, même quand la culture a lieu d'une manière identique et sur la même gélatine nourricière. Les colonies qui se sont développées chacune d'une cellule unique sont, cela va sans dire, le plus exposées à représenter des écarts individuels, tandis que, en proportion de la richesse en individus de la semence d'où provient une colonie, il y aura aussi des chances pour que la colonie en arrive à contenir ce qui est universel à l'espèce, tant dans un sens que dans l'autre. Guidé par ces considérations, j'ai fait les expériences suivantes. Des matras de 100$^{cc}$ furent remplis au quart de gélatine nourricière et bouchés avec un tampon de coton. A la surface de la gélatine on déposa une goutte de semence dans chaque matras.

J'ai fait la première série de ces expériences avec de la gélatine au moût et à la température ordinaire des habitations. Au bout de 14 jours, il s'était formé, dans les matras, de grandes taches rondes à surface cireuse et grisâtre. Dans le Bact. aceti, elles s'étalaient à plat en forme de rosettes crénelées; dans le Bact. Pasteurianum, ainsi que dans le Bact. Kützingianum, elles se bombaient légèrement, et le bord était uni. Les matras ayant séjourné environ 3 mois, les taches étaient toutes étalées et crénelées. Les taches du Bact. aceti se distinguaient par la forte accentuation de leur forme en rosette et l'aspect écailleux de leur partie centrale. Dans les deux autres espèces, la forme en rosette manquait; la partie centrale du Bact. Pasteurianum se composait de plis, tandis que celle du Bact. Kützingianum était légèrement écailleuse. A ce point, l'on pouvait donc nettement distinguer les taches des trois espèces.

[1]) Just Chr. Holm, Sur les méthodes de culture pure et, spécialement, sur la culture sur plaques de M. Koch et la limite des erreurs (Compte rendu des travaux du Laboratoire de Carlsberg, vol. III., 1re livraison, p. 1, 1891.)

La seconde série d'expériences fut également pratiquée avec de la gélatine au moût, mais à 25° C. Au bout de 6 à 9 jours, les taches des trois espèces étaient en somme les mêmes; cependant le Bact. aceti se distinguait des deux autres en ce que quelques-unes de ses taches étaient étoilées, tandis que, autrement, arrivées à ce point de développement, leur bord était entier tant dans cette espèce que dans les deux autres. Au contraire, au bout de 18 jours apparurent, entre les trois espèces, des différences marquées. Toutes les taches étaient alors grisâtres, cireuses, légèrement luisantes et arrondies; mais dans le Bact. aceti elles étaient étalées, crénelées et en forme de rosette, tandis que celles du Bact. Pasteurianum étaient légèrement convexes, entières de bord ou légèrement crénelées, avec des plis au centre ou disposées en un cercle concentrique autour d'une portion centrale petite, unie et lisse. A la vérité, les taches du Bact. Kützingianum ressemblaient à celles du Bact. Pasteurianum, mais s'en distinguaient nettement par l'uniformité de leur surface sans plis.

Dans une troisième série de ces expériences, j'employai la gélatine à la bière double, la température étant également de 25° C. Au bout de deux ou trois jours, les espèces formèrent toutes de grandes taches rondes, étalées, d'aspect grisâtre, cireux, et le bord était entier ou légèrement ondulé. Dans le Bact. aceti et le Bact. Pasteurianum la surface des taches était sèche, tandis que, dans le Bact. Kützingianum, elle était glaireuse. A ce point déjà, le Bact. Kützingianum pouvait se distinguer avec certitude des deux autres. Au bout de quatre à cinq jours, les taches des deux autres espèces devinrent, elles aussi, plus ou moins luisantes. Les cultures ayant séjourné de 18 à 20 jours, d'autres traits caractéristiques se dessinèrent. Alors on put reconnaître le Bact. aceti à ses taches crénelées, en forme de rosette; celles du Bact. Pasteurianum avaient le bord entier ou légèrement crénelé et le milieu plissé à l'instar d'une surface de cerveau. Dans le Bact. Kützingianum aussi, les bords étaient entiers ou légèrement crénelés; mais la surface était unie et sans plis. A ce point de l'évolution, l'on trouva donc aussi des caractères utiles pour différencier les trois espèces. Après le séjour d'un mois, les divergences évidentes précédemment observées commencèrent à s'effacer: il s'opéra un alternat non interrompu.

L'inoculation par strie et piqûre dans la gélatine mélangée d'extrait de viande et de peptone, dans la gélatine au moût et dans la gélatine au moût et à l'agar, ne donna aucun type de croissance capable de servir à distinguer les espèces entre elles. Il ne se produisit aucune solution de la gélatine. Ni sur milieu solide ni dans des liquides il n'y eut de développement de spores.

**Transformations morphologiques.**

La considération des nombreuses formes que peuvent présenter les bactéries acétifiantes (voir fig. 1, p. 187) nous fait voir qu'elles se groupent autour de trois types principaux, savoir les chapelets à bactéries en bâtonnets courts, les longs filaments et les formes renflées.

Les recherches dont parle la suite, ont pour tâche de découvrir quels sont les facteurs qui suscitent le développement de ces formes, et de démontrer en outre la manière dont une forme émane de l'autre. Dans mes „Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques" j'ai déjà en divers endroits cité des exemples du pouvoir morphogénique qu'a la température (Compte rendu des travaux

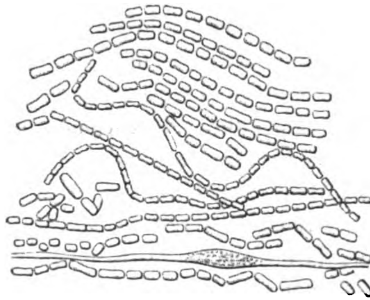


Fig. 6. *Bacterium Pasteurianum.*

Végétation d'un voile jeune sur bière double à 34° C. Grossissement linéaire de 1000 fois.

du Laboratoire Carlsberg, 1883, p. 42; 1886, p. 114). Ces résultats obtenus dans un champ tout différent, furent le point de départ de mes expériences sur les bactéries acétifiantes.

Dans la culture à la bière double, la température minima d'évolution était de 4 à 5° C. pour le Bact. aceti, de 5 à 6° C. pour le Bact. Pasteurianum et de 6 à 7° C. pour le Bact. Kützingianum; toutes trois, ces espèces avaient une température maxima avoisinant 42° C. et une température optima autour de 34° C.

Ces cultures ont fait constater que le Bact. Pasteurianum émettait la forme de chaîne à toutes les températures supérieures au minimum et n'excédant que peu la température optima. A des températures inférieures à 15° C., les bâtonnets des chapelets avaient souvent des dimensions extraordinaires, surtout en épaisseur, et contenaient des vacuoles très accentuées, ce qui donnait à la paroi un fort relief. Près du minimum, il était également commun de trouver des

cellules courtes présentant les gonflements les plus irréguliers. C'est surtout à des températures voisines de la température optima que la forme de chaîne se montrait dans toute l'énergie de son

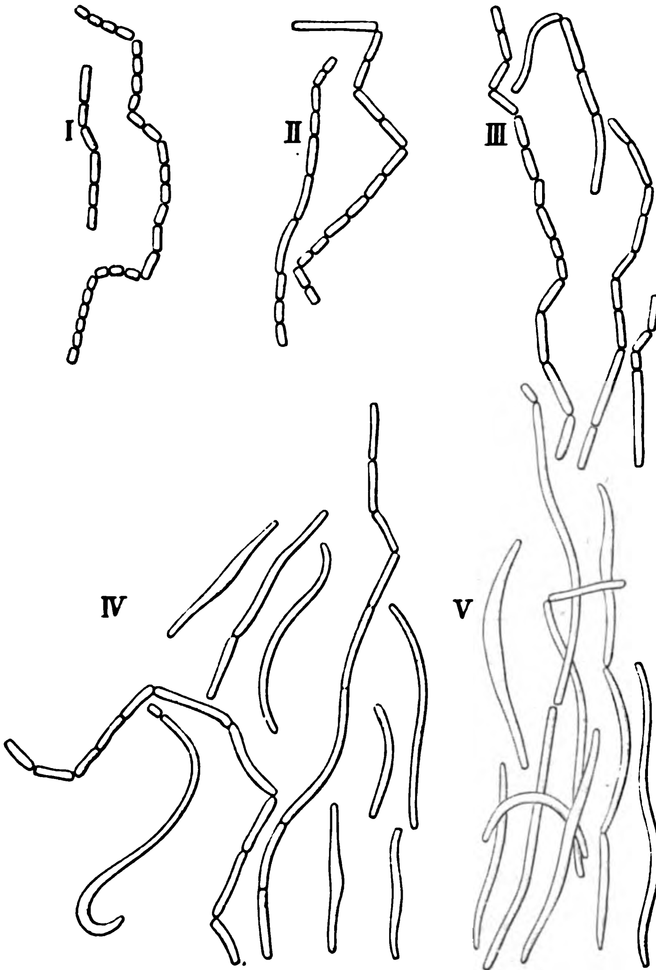



Fig. 7. *Bacterium Pasteurianum.*

Évolution de la forme de filament par culture en bière double à environ 40° 1/2 C. I montre le développement au bout de 2 heures, II, III, IV et V, respectivement au bout de 4, 6, 8—9 et 12 heures. L'indication du temps commence avec l'expérience. Grossissement linéaire de 1000 fois.

évolution et dans sa forme typique, ses bâtonnets étant remplis d'une matière plasmatique dense et un peu luisante. En général, ces bâtonnets étaient moindres qu'aux basses températures, et avaient

la forme régulière (voir fig. 6). La culture à cette température-là nous donne constamment un beau spécimen d'évolution caténulaire, non seulement sur bière double, mais encore sur bière basse de garde; en somme, cette forme se pose comme type dans les circonstances où la formation des membranes a lieu avec énergie.

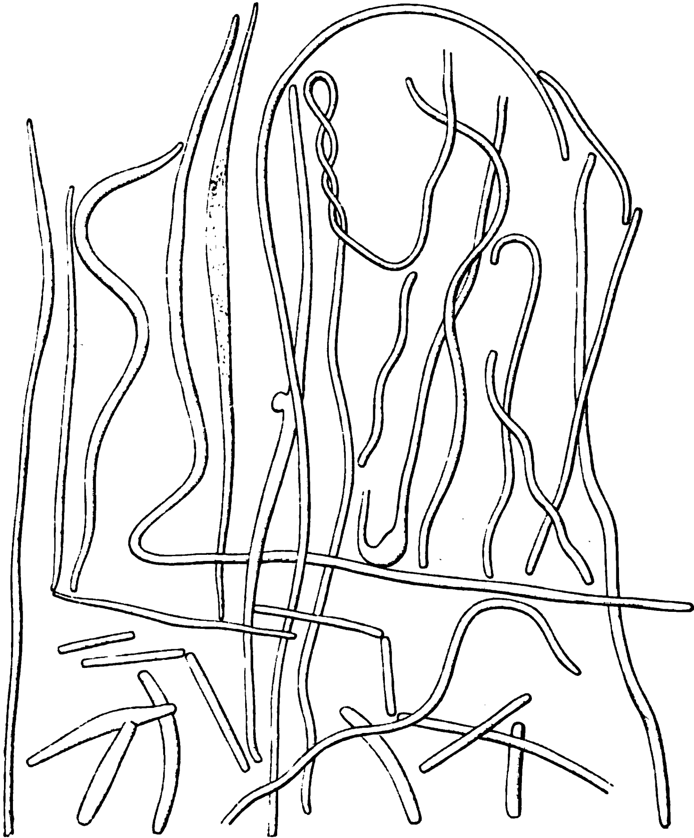


Fig. 8. *Bacterium Pasteurianum.*

Forme de filament due à une culture de 24 heures en bière double à 40° ½ C. Grossissement linéaire de 1000 fois.

Une des sections précédentes nous a appris qu'en bière double à 34° C. il se développe une membrane qui, dans l'espace de 24 heures, fait voile complet, si l'ensemencement consiste en cellules jeunes et vigoureuses. En transportant une trace de cette végétation dans un matras qui contient de la bière double et qu'on expose ensuite à 40°—40° ½ C., il s'y produira peu à peu une transformation totale des cellules. Déjà au bout de deux heures on peut observer

que les bâtonnets des chapelets ont commencé à s'étendre sensiblement (fig. 7. I). Cette extension augmente au fur et à mesure (II et III), mais d'une manière irrégulière, certains bâtonnets étant plus longs que d'autres. Au bout de huit ou neuf heures, on trouve soit des chapelets à très longs bâtonnets, soit des types de bacilles isolés (IV). A ce point-là, les bâtonnets se séparent très facilement; quatre heures plus tard, c'est par pure exception qu'on rencontre des chapelets, et leurs bâtonnets ont alors atteint la longueur extraordinaire de 40μ et au delà (V). Qu'on abandonne la culture durant 24 heures à la susdite haute température, il y aura une très faible production de voiles, et nous aurons alors une végétation comme celle de la fig. 8, savoir de la forme typique en filament. Si nous ne savions qu'elle émane de la forme de chaîne, nous supposerions qu'elle appartient à une tout autre espèce, tant ces deux formes diffèrent l'une de l'autre. Les filaments peuvent avoir une longueur de 200μ et au delà, tandis que les bâtonnets des chapelets dont ils proviennent, ne mesurent que de 2 à 3μ.

Dans l'expérience précédente, la culture fut pratiquée dans cinq des matras Freudenreich ci-dessus décrits et contenant de la bière double. Au début de l'expérience, on les infecta simultanément, puis on les mit dans un thermostat à la température désirée. Arrivant aux points désignés, on enleva au fur et à mesure un des matras pour l'examiner, sans déranger les autres; ils avaient donc la même température depuis le moment de l'ensemencement jusqu'à celui de l'examen. Ce procédé procure pour l'examen une puissante végétation et donne un aperçu des formes rencontrées aux divers échelons de l'évolution. Toutefois, si l'on désire apprendre plus exactement comment ont surgi les formes de cellules transformées, ce même procédé est insuffisant; car on doit alors suivre pas à pas au microscope l'évolution des individus. Dans le cas présent, le mieux est d'employer à cet effet une grande chambre humide du modèle Böttcher et comme milieu nourricier, soit la bière double, soit l'agar-agar à la bière double, dont on forme une mince couche à la surface inférieure du couvre-objet, sur quoi l'on introduit au milieu de cette couche quelques-unes des cellules dont on désire étudier le développement. Il est préférable de disposer le tout de manière à conserver la culture pure et l'on doit avoir soin de ne pas laisser le milieu nourricier exposé à l'évaporation.

La série de la fig. 9 est le résultat d'une culture de ce genre sur la table du microscope à environ 40° 1/2 C. En a—a''' il n'y a de transformé que la cellule la plus à gauche du chapelet, cette cellule s'étant considérablement allongée, puis divisée (a', a''). La cellule

qui en provient, s'est allongée en a''', puis divisée, en même temps que la cellule mère sous-jacente continuait son allongement. Les autres cellules du chapelet sont restées sans changement. Dans la chaîne b qui a cinq cellules, au contraire, quatre des cellules participent à l'évolution (b—b''). Aux susdites hautes températures, il se produit donc non seulement une transformation de bâtonnets dans les chapelets dus à l'ensemencement, mais encore une formation nouvelle

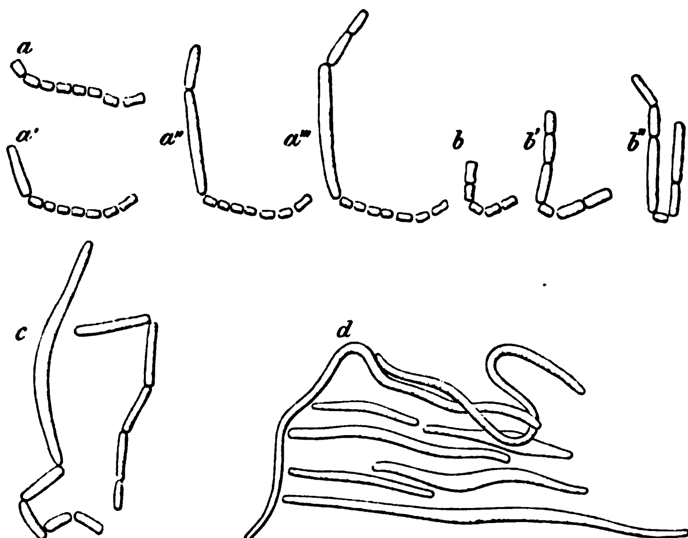



Fig. 9. *Bacterium Pasteurianum.*

Évolution de la forme de filament par culture en agar-agar à la bière double dans une chambre Böttcher, à environ 40° 1/2 C. a, chapelet composé de huit bâtonnets; a', a'', a''', le même, au bout de respectivement 6, 10 et 20 heures. b, chapelet composé de cinq bâtonnets; b', b'', le même, au bout de respectivement 5 et 9 heures. c, d, développement au bout de respectivement 10 et 21 heures. L'indication du temps commence avec l'expérience Grossissement linéaire de 1000 fois.

et une multiplication non interrompues. Les groupes de figures de c et d nous montrent les périodes finales de l'évolution.

Nous avons donc vu qu'à 40°—40° 1/2 C., et dans les susdites conditions, il se développe une végétation dont la forme typique est le filament. Si maintenant nous amenons à environ 34° C. les matras où elle se trouve, la transformation en chaîne se produit de nouveau. La même chose a lieu dans le cas où nous transportons la forme de filament dans de nouveaux matras avec de la bière double et qu'ensuite nous exposions ces matras à 34° C. Il va de soi que

la méthode d'investigation est la même que ci-dessus. La fig. 10 montre les diverses formes développées en ces cultures dans l'espace de sept heures. Au début de l'expérience, nous ne trouvons que des filaments non renflés; mais, au bout de quatre heures, les renflements

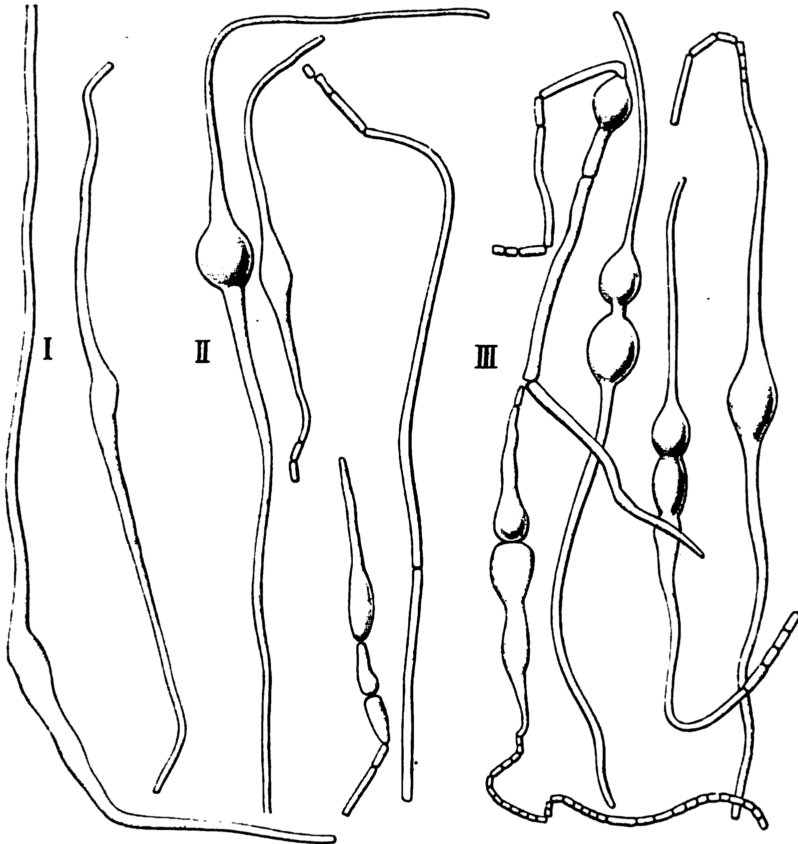



Fig. 10. *Bacterium Pasteurianum.*

Transformation de la forme de filament en formes renflées et en chapelets par culture en bière double à environ 34 ° C. I présente l'évolution au bout de 4 heures, II, celle au bout de 5 heures et III, celle au bout de 7 heures. L'indication du temps commence avec l'expérience. Grossissement linéaire de 1000 fois.

sont assez communs (I); puis ils augmentent et en nombre et en dimensions, et simultanément nous constatons que la scission commence (II). Quelques heures plus tard, il s'y est encore développé d'autres renflements, et la scission a fortement progressé. Nous trouvons

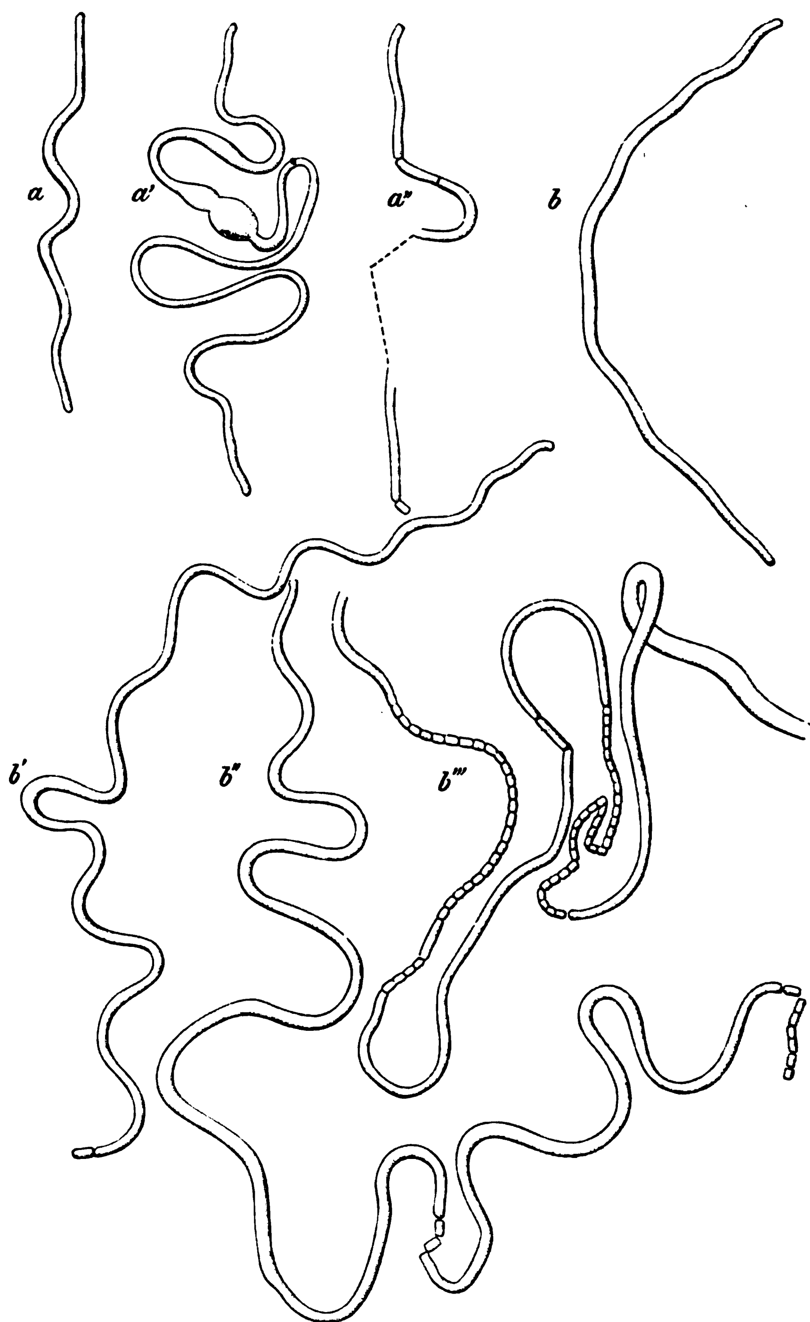



**Fig. 11.** ***Bacterium Pasteurianum.***

(voir l'explication p. 205).

Transformation de la forme de filament aux formes renflées et en chapelets par culture sur agar-agar à la bière double dans la chambre Böttcher à environ 34° C. a, filament sinueux; a', le même au bout de 5 heures 1/2, a'', au bout de 7 heures. Dans cette dernière image, la partie centrale à fort renflement est omise, et les portions terminales seules représentées. b, filament recourbé et légèrement sinueux; b', le même au bout de 4 heures, b'', au bout de 6, b''', au bout de 9 heures; cette figure ne montre que la partie centrale du filament. L'indication du temps part du commencement de l'expérience. Grossissement linéaire de 1000 fois.

souvent alors des filaments dont chacun porte deux ou plusieurs forts renflements, et les formes les plus irrégulières sont alors générales (III).

Si, dans la chambre humide et au microscope, nous suivons pas à pas l'ensemble de l'évolution subie par les filaments à 34° C., nous voyons qu'avant la scission ils croissent tant en longueur qu'en épaisseur, et souvent dans des proportions très considérables. L'augmentation d'épaisseur les rend plus ou moins fusiformes; en beaucoup de cas, leur gonflement est plus considérable en un ou plusieurs endroits qu'en d'autres. La fig. 11 a, a' nous montre un filament de ce genre, qui non seulement s'est considérablement allongé et épaissi en forme de fuseau, mais en outre a poussé deux forts gonflements pyriformes. C'est seulement après cela que la scission (a'') a commencé. En b—b''' j'ai représenté la transformation subie par le filament sinueux, b, dans l'espace de 9 heures. Avant la scission, le filament s'allongea d'environ sa longueur (b'); l'accroissement en épaisseur durant les premières périodes (b', b'') pouvait bien se laisser poursuivre, mais il était relativement faible; plus tard il fit de grands progrès (b'''). Cette série d'évolutions nous montre également que, après l'entrée de la scission en pleine activité, un filament peut continuer à croître aussi bien en longueur qu'en épaisseur (b'', b''').

La scission peut commencer tant aux extrémités qu'au milieu; souvent les petits articles sont séparés par de très grands articles; bref, il règne la plus grande irrégularité à cet égard. En fait d'épaisseur on trouve aussi tous les degrés de transition depuis la forme régulière du fuseau jusqu'à la forme de poire et d'ovale très accentuée. Comme le montrent les dessins, les formes les plus diverses peuvent se présenter durant cette évolution; il faut toutefois, comme on l'a dit, les considérer toutes comme ayant la même valeur. Il ne m'a pas été rare de trouver des gonflements sphériques dont le diamètre était de 11$\mu$. Le filament entier peut se sectionner, et telle est sans doute la règle. Ceci est également vrai des portions épaisses et gonflées, dont toutefois la partie la plus

épaisse ne se divise pas (voir les fig. 10 et 12). Si, durant un ou deux jours, on suit les cultures sur bière double telles qu'on vient de les décrire, on pourra observer la résorption d'un nombre croissant de forts renflements (fig. 12).

Si le matras à la bière double où la forme de filament a été ensemencée, est abandonné à lui-même durant 24 heures à 34° C., il s'y produit la formation d'une forte membrane composée des chaînes typiques avec leurs articles en courts bâtonnets. Dans les chambres humides il se passe un peu plus de temps avant que cette trans-

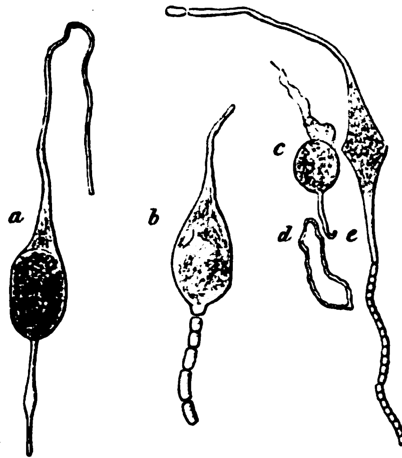



Fig. 12. *Bacterium Pasteurianum.*

Fragments de filaments renflés, au bout d'un ou deux jours de culture dans la bière double et à 34° C. En a, le renflement pyriforme se termine en deux filaments très minces; en b, la scission a atteint la large base de ce renflement; en c, le renflement est en train de se disloquer, une partie du plasma s'épanchant; d montre l'épaisse paroi d'un renflement dont le plasma est sorti; e, renflement formé en fuseau très accentué, avec deux filaments en voie de scission. Grossissement linéaire de 1000 fois.

formation en soit arrivée là. De la forme en filament nous voici donc revenus à la forme en chaîne, et nous avons vu que les formes renflées sont un chaînon intermédiaire dans ce cycle d'évolution. Dans les circonstances présentes les facteurs morphogéniques sont les températures de 34° et 40°—40 ½ C. Maintenant que nous connaissons ces facteurs, nous pouvons à plaisir susciter tel type que nous voudrons.

Mes expériences ont montré que la température est un facteur morphogénique, mais à la seule condition que la culture ait lieu dans un milieu nourricier favorable et riche en extrait. Si, au lieu d'un

tel milieu, nous prenons par ex. de la bière basse de garde ordinaire, l'évolution sera différente. C'est donc la combinaison de la température avec un milieu nourricier spécial qui détermine le résultat, et

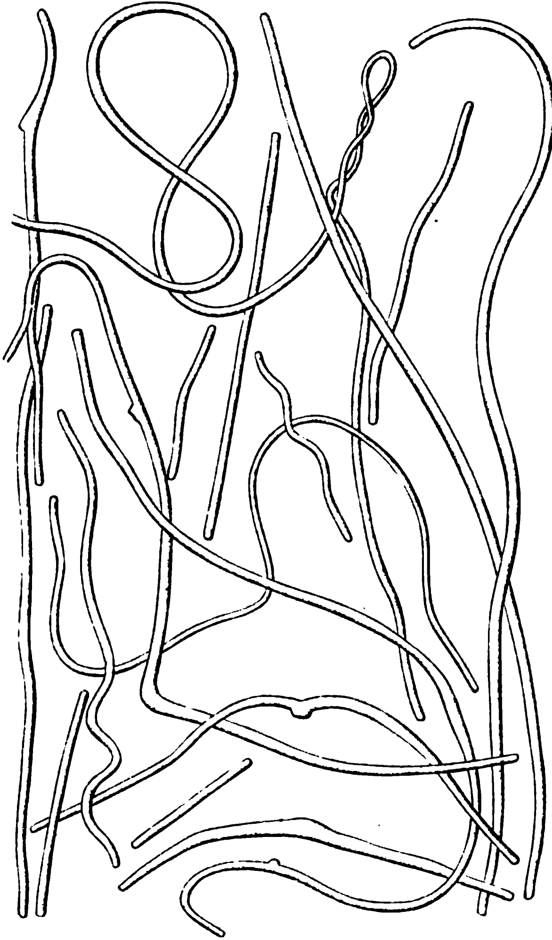


Fig. 13. *Bacterium aceti.*

La forme de filament; culture âgée de 24 heures en bière double à 40°—40° ½ C. Grossissement linéaire de 1000 fois. Dans certains endroits les filaments sont représentés un peu trop gros.

nous pouvons y ajouter un troisième élément actif, savoir l'âge des cellules en question au début de l'expérience. En effet, les phénomènes ci-dessus décrits ne se manifestent que si les cellules sur lesquelles nous faisons les expériences, sont jeunes et vigoureuses.

Les recherches précédentes sur les transformations morphologiques ont toutes été faites sur le Bact. Pasteurianum. Toutefois, dans les mêmes circonstances, le Bact. aceti et le Bact. Kützingianum subissent une évolution analogue en tout ce qu'elle a d'essentiel.

Les phénomènes d'évolution décrits dans cette section, je les ai retrouvés, en leurs traits principaux, dans les bactéries acétifiantes soumises à un essai sous ce rapport, mais pour la part de certaines espèces, les expériences ont dû être faites à des températures inférieures aux susdites. Il doit donc régner une sorte de régularité qui, probablement, englobe un assez fort groupe d'espèces. Je suis également fondé à présumer que tel est aussi le cas pour plusieurs bactéries autres que ces bactéries acétifiantes. Comme on pouvait s'y attendre, il a été constaté que la faculté de développer les diverses formes de cellules existe à différents degrés dans les espèces.

En poursuivant la culture des Bact. aceti, Bact. Pasteurianum et Bact. Kützingianum durant 48 heures à 40°—40° 1/2 C., nous pourrons fréquemment observer que les filaments aussi à cette haute température croissent en longueur et en épaisseur et se garnissent des renflements irréguliers souvent mentionnés. Je vois dans ce phénomène un signe que la cellule filiforme en question se prépare à une scission. En effet, les filaments ne supportent que pendant un temps relativement court l'exposition à cette haute température défavorable, et par conséquent la vie de l'espèce est menacée. Si cette végétation de cellules filiformes n'est exposée qu'à une température de 39° C., non seulement les types gonflés se développent en grand nombre au bout de deux jours, mais ils en arrivent aussi à pulluler assez vigoureusement. Ces observations indiquent que les gonflements formés aux hautes températures ont la même valeur que ceux qui se forment quand le filament passe d'une haute température à une température inférieure, 34° C. dans les cas précédents. Il est plus malaisé d'expliquer l'apparition des filaments et des cellules gonflées qui assez souvent se trouvent à l'état de mélange secondaire dans des végétations dont la masse principale consiste dans la forme en chaîne typique, et qui sont engendrés par ensemencement des chapelets à 34° C. Parfois, mais pas toujours, ils se sont produits quand une végétation séjournait pendant un assez long temps. Nous ne savons rien de leur importance; jusqu'à nouvel ordre nous devons les ranger parmi les irrégularités.

Des filaments renflés, tels que les représentent mes fig. 10, 11 et 12, ont été considérés par Nägeli et ses successeurs comme des formes anormales qui ne rentrent pas dans l'évolution normale, mais sont au contraire un

signe que la cellule en question est en voie de mourir. Jusqu'ici toutefois personne n'a approfondi l'influence qu'ils pouvaient avoir. (Voir les manuels de De Bary, Zopf et autres.) Déjà dans mon mémoire susmentionné et paru en 1879, j'avais montré, soit par le texte, soit par les illustrations, que les filaments se gonflent pendant que leur développement est en pleine marche, et qu'ils se multiplient par scission. Les recherches que j'ai faites sur l'évolution et que j'ai

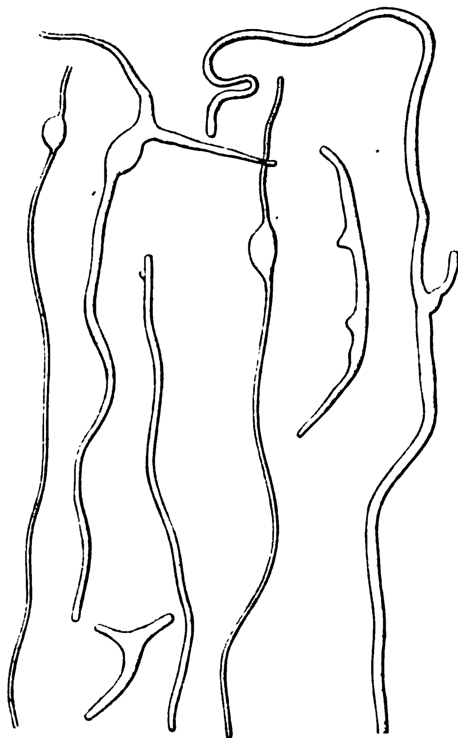


**Fig. 14.** ***Bacterium aceti.***

Types cellulaires extraordinaires ayant plusieurs jours de culture en moût et en bière double à 39—41° C. Grossissement linéaire de 1000 fois.

communiquées dans ce qui précède, montrent que ces formes en apparence anormales se produisent régulièrement et indiquent précisément qu'une croissance énergique a lieu. Dans ces limites l'opinion de Nägeli est donc généralement invalidée.

Au commencement de cette section, là où il est parlé du Bact. Pasteurianum, nous avons appris que, même à des températures inférieures, il se produit une transformation morphologique particulière.

Il en est de même du Bact. aceti; le Bact. Kützingianum n'a pas été étudié sous ce rapport. Aussi, à 5°—6° C., le Bact. aceti émet une quantité de cellules courtes, fortement gonflées, fréquemment pyriformes, mais pouvant du reste se produire sous les formes les plus irrégulières.

Malgré l'abondance de formes avec laquelle se présentent les trois espèces dont la morphologie et l'évolution ont été, dans ce qui précède, l'objet spécial de nos recherches, les cellules ramifiées n'en sont pas moins des cas rares. La fig. 14 représente trois de ces types; on pourra peut-être considérer comme un commencement de ramification les nodosités qui se trouvent latéralement sur deux des filaments. Les deux filaments très minces, à forts renflements pyriformes ont également leur originalité et doivent par conséquent être compris dans ce groupe de types extraordinaires.

---

### Limite de la vitalité.

Au point de vue biologique il y a intérêt général à examiner combien de temps un organisme peut persister à vivre dans des conditions déterminées. Pour la part des microorganismes tels que ceux dons nous nous occupons ici, ces recherches ont en outre un intérêt pratique en ce qu'elles nous enseignent quel est le meilleur moyen de conserver, le plus longtemps possible, ces microorganismes à l'état vivant, et cela est surtout important pour les travaux des laboratoires bactériologiques.

Mes études sur les bactéries acétifiantes ayant dû par suite des circonstances embrasser une longue suite d'années, on a pratiqué, à diverses époques, de grandes et de petites séries de cultures. Après avoir employé ces cultures aux essais auxquels elles devaient momentanément servir, je les ai mises de côté afin de les employer plus tard à des expériences sur la limite de la vitalité. C'est de cette manière que j'ai rassemblé la majeure partie des matériaux pour mes recherches à cet égard. Une difficulté particulière que présente ce terrain, c'est qu'on a à compter par longs intervalles. Comme on le verra par la suite, telle analyse embrasse en plus d'un cas six années et au delà. Les recherches qu'on a faites jusqu'ici sur la limite de vitalité des microorganismes, ne consistent donc qu'en analyses éparses et en observations isolées. Pour la part des bactéries acétifiantes, c'est la première fois qu'on fait une contribution à cet égard.

Voici brièvement le procédé: Des cellules jeunes et vigoureuses furent les unes semées dans la bière double, la bière basse de garde,

l'eau de levure, la saccharose en solution, la gélatine au moût et la gélatine à la bière double, les autres mises en petite quantité, sur un œillet de platine, introduit ensuite dans un matras Freudenreich vide pour l'y conserver. Les matras furent tous placés dans une armoire sans lumière et à la température ordinaire. Les cellules que portait l'œillet de platine, furent ici exposées à un dessèchement assez lent. A diverses époques on prit des échantillons et on les transporta dans la bière double, ainsi que parfois dans de la bière basse de garde, à 34° C. Ces cultures restèrent de 14 à 16 jours, excepté celles qui avant l'expiration de ce terme avaient produit des membranes, et quand aucune évolution ne s'était manifestée dans les susdites circonstances, les cellules ainsi essayées étaient considérées comme mortes. Quand le premier échantillon ne donnait signe de vie, on en prenait de la même manière un second et un troisième, en sorte que les cellules des matras en question furent tour à tour toutes essayées.

Le Bact. aceti s'est maintenu vivant dans la bière basse de garde pendant plus de 4 ans $^1/_2$, dans l'eau de levure 1 an $^5/_6$, mais y fut trouvé mort au bout de 2 ans $^3/_4$. Dans la saccharose, il vivait encore après plus de 1 an $^1/_4$, et au bout de 5 mois sur la gélatine au moût et sur la gélatine à la bière double.

Le Bact. Pasteurianum vivait encore dans la bière double après plus de 2 ans $^1/_2$, dans la bière basse de garde après plus de 6 ans $^2/_3$, bien qu'en un seul cas sa végétation ait semblé éteinte dans ce liquide au bout de 1 an $^2/_3$. En eau de levure il avait conservé la vie, même au bout de 4 ans, et dans la saccharose, au bout de 1 an $^1/_4$, mais dans ce dernier liquide il était mort au bout de 1 an $^1/_2$; sur la gélatine au moût et sur la gélatine à la bière double, il se maintint vivant pendant plus de 5 mois. A l'état sec sur le fil de platine, les cellules étaient vivantes au bout de 4 mois et mortes au bout de 5 mois.

Le Bact. Kützingianum vécut dans la bière double pendant plus de 3 ans $^5/_6$, dans la bière basse de garde durant plus de 4 ans $^5/_6$, sur la gélatine au moût et la gélatine à la bière double, pendant plus de 5 mois.

L'espèce de Zeidler, mentionnée dans le texte danois, se maintint vivante dans la bière basse de garde 3 ans $^1/_2$ et plus, et l'espèce dont il est parlé au même endroit et que j'avais isolée de la bière double aigre, vécut plus de 2 ans dans la bière basse de garde: en examinant ses végétations dans la bière double on constata qu'elles y restaient vivaces pendant plus de 3 ans $^2/_3$.

Ces analyses se rangent en deux groupes: celles où les cellules se trouvaient dans un milieu nourricier, et celles qui n'étaient pas

dans ce cas-là. Ces dernières seules nous donnent des renseignements sur la limite de vitalité des cellules par lesquelles l'expérience a commencé, tandis que les autres analyses servent à déterminer la limite de vitalité pour l'ensemble de la végétation dans les conditions de croissance données.

D'après ce qui précède, nous devons donc jusqu'à nouvel ordre considérer la bière basse de garde comme le meilleur moyen de conserver les bactéries acétifiantes.

---

## 3. Rapport des bactéries acétifiantes avec la fabrication de la bière.

Les bactéries acétifiantes sont regardées comme types morbifères très dangereux tant pour la fermentation du vin que pour le brassage et la distillerie. Les recherches précédentes nous ont montré que ces bactéries ne se développent d'une manière vigoureuse que quand elles ont libre accès à l'air et que la température est élevée. Cela nous permet de conclure que c'est à peine si pour les brasseries à fermentation basse elles peuvent être aussi dangereuses qu'on le suppose généralement. Dans les brasseries à fermentation haute, elles trouvent des conditions plus favorables, et c'est aussi pour cela qu'elles y font plus de dégât.

Pour élucider la manière dont se comportent les bactéries acétifiantes, quand on les introduit dans la bière aux divers degrés de la fermentation basse, j'ai fait, dans les conditions d'exploitation de la brasserie, des expériences qui se trouvent décrites dans le texte danois. Elles montrent que le Bact. aceti et le Bact. Pasteurianum étaient encore présents et vivants dans la bière basse de garde entièrement prête, l'infection ayant lieu, soit au début, soit à la fin de la fermentation principale, mais que ces bactéries ne se sont trahies ni dans la cave de fermentation ni dans celle de garde. Ce fut seulement lors de la mise en bouteille de la bière basse de garde et lors de son exposition à un surcroît de température qu'il y eut possibilité pour une évolution de se produire, tandis que, dans les bouteilles bien bouchées, la bière ne s'acétifia pas. Même à une température favorable, un bon bouchage peut, dans les circonstances décrites ici, empêcher les bactéries de gâter la bière. Ce qui est dit ici, peut être maintenu en substance pour le cas où l'on commence par inoculer les bactéries acétifiantes dans la bière basse de garde sortie de la cave de garde. Tient-on l'air à l'écart, il n'y aura pas d'évolution, même si la bière est exposée à une chaleur assez forte. De temps à autre, la bière basse de garde ordinaire, mise en bouteille comme d'habi-

tude, fut infectée de jeunes et vigoureuses végétations du Bact. aceti et du Bact. Pasteurianum. Ensuite on boucha bien les bouteilles et on les mit avec les bouteilles de contrôle dans une armoire sans lumière et à la température ordinaire. Lorsqu'au bout d'une quinzaine de jours on fit l'examen, la bière des bouteilles infectées avait la même composition que celle des bouteilles de contrôle: les bactéries acétifiantes n'avaient eu aucune influence.

S'agit-il de bactéries acétifiantes, il importe donc avant tout de veiller à ce que les fûts servant au transport et les bouteilles soient bien bouchés et également, cela va sans dire, bien remplis.

---

## 4. Classification.

Les bactéries acétifiantes sont, comme nous l'avons appris plus haut, classées par le système de Zopf dans le genre Bacterium. En face des connaissances actuelles, on ne peut pas non plus leur donner une place plus convenable. En général on les conçoit comme un groupe à part enclavé dans ledit genre très étendu, groupe qui se distingue principalement par le fait que ses espèces possèdent à un degré éminent la propriété de transformer par oxydation l'alcool en acide acétique. Les caractères communs à ces espèces ont été mentionnés dans le texte danois; je donne ci-dessous un aperçu de leur classification.

*A. Espèces à membranes faciles à séparer et dans lesquelles la formation gélatineuse ne peut s'observer qu' à l'aide d'une préparation spéciale.*

**1. Gelée non colorée par la solution d'iode ni par l'iodure de potassium iodé.**

Bacterium aceti. (Ulvina aceti Kützing 1837. Mycoderma aceti Thomson et Pasteur. Bacterium aceti Zopf.)

Dans la bière double à 34° C., cette espèce forme au bout d'un jour une membrane glaireuse et unie, où les cellules sont en général des bâtonnets ressemblant à des sabliers et arrangées par chaînes; c'est seulement par exception qu'on trouve d'assez longs bâtonnets et filaments avec ou sans renflements (fig. 2, p. 192). A 40°—40 $^{1}/_{2}$° C., développement de filaments longs et minces (fig. 13,

p. 207). Dans les cultures sur plaque avec gélatine de moût, l'espèce en question développe au bout de quatre jours, à 25° C., des colonies rondes, généralement convexes et à bord entier, plus rarement en forme d'étoile, grises et cireuses à la lumière incidente, bleuâtres par transparence. Elles consistent principalement en petits bâtonnets isolés; la forme en chaîne est refoulée. Les colonies sur gélatine mélangée d'extrait de viande et de peptone ont essentiellement le même aspect, mais sont entourées de zones laiteuses, séparées chacune de sa colonie par une ceinture annulaire et claire. L'ensemencement par gouttes sur une couche épaisse de gélatine de moût à 25° C. émet, au bout de 18 jours, des colonies étalées, crénelées, formant rosette. Un ensemencement analogue sur une couche épaisse de gélatine de bière double à la même température forme, au bout de 2 ou 3 jours, des colonies rondes, étalées, à bords entiers ou légèrement ondulés et à surface sèche; au bout de 18 à 20 jours, elles prennent aussi la forme de rosette. Dans la bière double, la température maxima pour la croissance est d'environ 42° C., la température minima de 4 à 5° C. Cette espèce se trouve généralement dans les bières et de haute et de basse fermentation. Je l'ai également observée assez souvent dans la poussière athmosphérique, et de temps à autre M. Holm l'a trouvée en analysant l'eau du Vieux-Carlsberg.

Des espèces avoisinantes et en certains cas probablement identiques à celle qui nous occupe, ont été observées par MM. Peters, Lindner, Zeidler et Wermischeff, ainsi que l'espèce isolée par moi de bière acétifiée de haute fermentation, espèce nommée plus haut.

**2. Gelée colorée en bleu par l'iode en solution et l'iodure de potassium iodé.**

Bacterium Pasteurianum. (Mycoderma Pasteurianum E. Chr. Hansen 1879. Bacterium Pasteurianum Zopf.)

Sur la bière double à 34° C., cette bactérie émet, au bout de 24 heures, un voile sec, rapidement ridée et plissé et s'élevant un peu au-dessus de la surface du liquide. Ses cellules forment, comme celles du Bact. aceti, de longs chapelets, mais en moyenne ces cellules sont plus grandes et surtout plus épaisses (fig. 3, p. 193). Sa forme de filament à 40°—40° ½ C. (fig. 8, p. 200) est aussi un peu plus forte que dans le Bact. aceti, différence qui n'est pas mise assez en relief dans les images des deux espèces. Les colonies qui se développent au bout de 4 jours à 25° C. dans des cultures sur plaque de gélatine de moût, sont généralement moindres

que celles du Bact. aceti, auxquelles elles ressemblent d'ailleurs. Elles consistent principalement en chapelets typiques. Les colonies de la gélatine mélangée d'extrait de viande et de peptone ont le même aspect que ces dernières, et sont entourées de zones semblables. L'ensemencement par gouttes sur une couche épaisse de gélatine de moût, à 25° C., développe, au bout de 18 jours, des colonies à plis, un peu convexes, à bord entier ou légèrement crénelées. Sur gélatine de bière double un ensemencement analogue produit, en pareilles circonstances, des colonies qui, au bout de 2—3 jours, ressemblent aux colonies correspondantes du Bact. aceti et qui, comme celles-ci, ont une surface sèche; au bout de 18 ou 20 jours, elles sont ornées de plis. Dans la bière double, la température maxima de la croissance est d'environ 42° C., la température minima, de 5°—6° C. Le Bact. Pasteurianum se trouve aux mêmes points que le Bact. aceti; seulement il est plus fréquent dans les brasseries à haute fermentation que dans celles de fermentation basse.

Bacterium Kützingianum. E. Chr. Hansen 1893.

La membrane qui se forme sur la bière double à 34° C. au bout de 24 heures, ressemble beaucoup à celle de l'espèce précédente, mais s'en distingue par le fait qu'elle s'étend fort au-dessus du niveau du liquide en rampant le long des parois du matras. Elle consiste en petites bâtonnets, le plus souvent indépendants ou simplement accouplés et formant rarement de chaînes de longueur notable (fig. 4, p. 193). La forme de filament à 40°—40° ½ C. se calque assez bien sur celle du Bact. Pasteurianum, mais contient relativement plus de filaments courts. Dans les cultures sur plaque de gélatine de moût, l'espèce en question développe, au bout de 4 jours, à 25° C., des colonies de même aspect que celles de l'espèce précédente, mais composées presque exclusivement de petits bâtonnets indépendants. Il est très rare d'y trouver des chapelets. Les colonies de gélatine mélangée d'extrait de viande et de peptone sont calquées sur les colonies correspondantes du Bact. aceti et du Bact. Pasteurianum. L'ensemencement par gouttes sur une couche épaisse de gélatine de moût, à 25° C., développe, au bout de 18 jours, des colonies comme celles du Bact. Pasteurianum, mais qui s'en distinguent nettement par l'uni de leur surface exempte de plis. Une culture analogue sur gélatine de bière double donne, au bout de 2—3 jours, des colonies comme celles du Bact. aceti et du Bact. Pasteurianum, mais à surface glaireuse; au bout de 18 à 20 jours, la surface de ces

colonies est toujours unie et sans plis. Dans la bière double, la température maxima de la croissance est d'environ 42° C., la température minima, de 6° à 7° C. L'espèce en question s'est trouvée dans la bière double; elle ressemble probablement pour la distribution au Bact. Pasteurianum.

*B. Espèces à membrane où la formation de gelée devient cartilagineuse et coriace.*

Bacterium xylinum. Adr. J. Brown 1886.

*Décembre 1893.*




U.C. BERKELEY LIBRARIES
C027235461




Digitized by Google